

Санкт-Петербургский государственный университет

Физический факультет

Кафедра электроники твёрдого тела



**Локальная электронная структура и иерархическая
организация костной ткани**

Магистерская диссертация студента

дневного отделения

Самойленко Дмитрия Олеговича

Научный руководитель:

д. ф.-м. н., профессор СПбГУ

Павлычев А.А.

Рецензент:

д. ф.-м. н., профессор ФГБУН Коми научного центра Уральского

отделения Российской академии наук

Сивков В.Н.

Оглавление

Глава 1. Введение	3
Глава 2. Иерархическая организация костной ткани (литературный обзор)	8
Глава 3. Теоретическая модель	18
3.1. Модель атомного строения копланарного конгломерата нанокристаллитов	18
3.2. Модель электронного строения	21
Глава 4. Экспериментальные результаты	34
4.1. БТС РСП костной ткани вблизи Ca 2p, P 2p и O 1s порогов ионизации	34
4.1.1. Ca 2p	36
4.1.2. O 1s	38
4.1.3. P 2p	40
4.2. Температурные зависимости БТС РСП костных тканей .	42
4.2.1. Ca 2p	43
4.2.2. O 1s спектры	47
Глава 5. Основные результаты и выводы	51
Глава 6. Заключение	53
Список литературы	54

Глава 1

Введение

Костная ткань – наиболее сложная иерархически и спирально организованная, наноструктурированная материя в природе. Ее основными компонентами являются молекулы каллогена, нанокристаллиты гидроксилатапатита(ГА) $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ и вода, расположенная как вне, так и внутри кристаллитов.

Для современного общества проблемы, вызванные патологией скелета, имеют огромное медицинское значение и играют важную социально-экономическую роль, которая связана с огромными экономическими затратами направленными на лечение, реабилитацию, обслуживание пациентов с остеоартритом и последствиями остеопороза. В России за период с 2006 по 2011 годы распространенность остеоартрита возросла на 35%. Это заболевание встречается у каждого третьего пациента в возрасте от 45 до 64 лет и у 60-70% лиц старше 65 лет. В 2009 остеоартрит являлся четвертой по частоте причиной госпитализации. Ежегодные затраты в мире, по различным оценкам, колеблются в диапазоне от 3,41 до 60 миллиардов долларов, что связано только с медицинским обслуживанием (51%) и снижением производительности труда (49%).

Исследование физических основ взаимосвязи электронной и атомной структуры с иерархически организованной нано- и мезоструктурированной костной тканью является значимыми не только для развития новых перспективных методов медицинской диагностики и визуализации состояния костной ткани на наноуровне, но и для достижения новых знаний. Учась у природы, мы получаем комплекс знаний необходимых для создания опережающих нанотехнологий, биодизайна новых материалов,

тонкой настройки (саморегулирования) обменных процессов в организме человека, решения задач палеонтологии и других проблем современного естествознания.

В основе современных представлений о структурно-функциональной организации скелета в норме и при патологии лежат морфологические модели, характеризующие особенности его структурной организации и функциональные свойства. К сожалению, их описательный характер затрудняет использование этих моделей для количественного изучения физико-химических и хронобиологических процессов в костных тканях. Их изучение требует знаний о физических и механических свойствах наноэлементов, формирующих костную ткань. Переход к наномасштабу требует квантово-механической характеристики наноэлементов, которая невозможна без систематических исследований атомного и электронного строения, а также особенностей химического связывания атомов в нано-элементах. В последнее время широкое применение получила электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, мало угловая дифракция рентгеновских лучей, ядерный магнитный резонанс, ИК-спектроскопия.

В данной работе основное внимание сконцентрировано на минеральном матриксе, который, согласно современным медико-биологическим исследованиям [25, 24], имеет четырехуровневую иерархическую организацию: внутренняя атомная структура минерала, копланарное объединение нанокристаллитов минерала и их макроструктурные объединения в единый комплекс внутри каждого костного органа. В основу теоретического исследования электронного и атомного строения минерального матрикса положена оригинальная квантово-механическая 3DSL модель, предложенная ранее при выполнении бакалаврской работы. Эта морфологически обоснованная модель костной ткани описывает поведение электронной волны

в трехмерной сверхрешетке (3DSL), составленной из «черных-наноящичков-в-мутной-воде». Дальнейшее развитие данной модели в направлении более полного учета особенностей влияния иерархической организации скелета, всесторонней ее проверки с использованием различных современных экспериментальных методов и предсказание новых особенностей локального электронного и атомного строения костной ткани в норме и патологии являются основными задачами, поставленными перед данной работой. Поставленные цели и задачи являются крайне актуальными для научного материаловедения и современной медицины, в частности, для создания и развития новых методов медицинской нанодиагностики и визуализации.

Конкретными научными задачами, поставленными перед магистерской работой, являются:

1) изучение особенностей электронной и атомной структуры трехмерной сверхрешетки на основе минерала ГА, развитие теоретического 3DSL подхода к описанию электронного строения минерального матрикса костной ткани;

2) теоретический и экспериментальный анализ влияния сверхпериодичности на рентгеновские переходы в минеральном матриксе костной ткани вблизи $Ca2p$, $P2p$ и $O1s$ порогов ионизации; особо внимание предложено уделить спектральному сдвигу рентгеновских переходов в костной ткани по сравнению с соответствующими переходами в кристалле ГА и изучению взаимосвязи этого сдвига с иерархической организацией костной ткани;

3) исследованию роли воды в формировании минерального матрикса костной ткани; особо внимание предложено уделить температурной зависимости рентгеновских переходов в костной ткани;

Научная новизна поставленной задачи определяется тем, что в данном проекте костная ткань рассматривается, прежде всего, как материя с многоуровневой иерархически организованной структурой. Влияние иерархической организации на локальную электронную и атомную структуру костной ткани, ее атомно-молекулярную архитектуру и динамику составляющих компонентов остается до настоящего времени практически не изученным.

В главе 2 кратко изложены существующие морфологические модели иерархического строения скелета и известные данные об электронном и атомном строении кристалла ГА. На основе этих данных в главе 3 предложена оригинальная теоретическая модель (3DSL) трехмерной сверхрешетки, позволяющая учесть взаимосвязь иерархической организации минерального матрикса с его электронной структурой. Анализ указанной взаимосвязи в рамках предложенной модели позволил высказать ряд предположений и получить ряд соотношений, характеризующих влияние иерархической организации на электронную и атомную структуру костной ткани. Экспериментальной проверке этих предположений посвящена глава 4. В разделе 4.1 представлены спектральные зависимости поглощения рентгеновского излучения вблизи Ca и $P2p$ и $O1s$ порогов ионизации в нативной костной ткани крыс, результаты сравнительного анализа которых подтвердили применимость данной модели. Для более детального изучения влияния иерархической организации на локальную электронную и атомную структуру костных тканей и применимости модели в разделе 4.2 представлены результаты исследования температурной зависимости рентгеновских спектров поглощения вблизи $Ca2p$ и $O1s$ порогов ионизации костных тканей крыс разного возраста. Основные выводы данного теоретического и экспериментального исследования сформулированы в

главе 5.

Глава 2

Иерархическая организация костной ткани (литературный обзор)

Костная ткань в составе скелета играет чрезвычайно важную роль несущего элемента в организме млекопитающих, птиц, земноводных, пресмыкающихся и рыб. Несмотря на огромное количество фундаментальных физико-химических и медико-биологических исследований костной ткани [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14] на настоящий момент нет чёткого представления о механизмах, которые определяют ее физико-химические и механические свойства на наноуровне.

Можно выделить две основные особенности костной ткани, способствующие выполнению её основных задач. Прежде всего, кость - биологический композит, и потому в ней активно протекают обменные процессы (во многом благодаря содержащейся воде [52]), что позволяет локально перестроить её структуру в соответствии изменению внешних условий. Организм, как полагают, способен путём введения соответствующих примесей в структуру костной ткани нужным образом изменять свойства соединений, её составляющих. Во-вторых, имея сравнительно простые составляющие, кость обладает иерархической структурой, что также обеспечивает её высокую функциональность [49, 38, 24, 2, 51, 52, 53, 54, 55]. Костная ткань состоит из взаимодействующих структур: клеток кости, межклеточного органического матрикса кости (органического скелета кости) (25%), основного минерализованного межклеточного вещества (50%) и воды, связанной с коллагеном и протеогликанами. 90% органики составляет коллаген и только 10% другие органические молекулы

(гликопротеин остеокальцин, остеоонектин, остеоопонтин, костный сиалопротеин и другие протеоглики), функции которых пока не вполне ясны, но, несомненно, что они участвуют в управлении минерализацией основного вещества - перемещением минеральных компонентов кости [15]. Минеральные вещества, размещенные в составе основного вещества в органическом матриксе кости представлены кристаллами, построенными главным образом из кальция и фосфора (ГА $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Размеры кристаллитов в минерализованной фазе определяются возрастом [34, 60, 61] и зависят от атомных внедрений и замещений [35, 58, 59, 28]. Отношение кальций/фосфор в норме составляет $\approx 1,3 - 2,0$. Кроме того, в кости обнаружены ионы магния, натрия, калия, сульфата, карбоната, гидроксильные и другие ионы, которые могут принимать участие в образовании кристаллов. Каждое коллагеновое волокно компактной кости построено из периодически повторяющихся сегментов. Длина сегмента волокна составляет ≈ 64 нм ($64 \cdot 10^{-9}$) м. К каждому сегменту волокна примыкают кристаллы ГА, плотно его опоясывая.

Коллагеновые волокна обеспечивают эластичность, упругость кости, ее сопротивление растяжению, в то время как кристаллы обеспечивают её прочность, жесткость, ее сопротивление сжатию. Здесь следует отметить важную роль присутствия воды, так как именно она во многом определяет термические и механические свойства кости [56, 35, 14], в частности известно, что растяжимость фибрилл в обычном и дегидрированном состояниях различаются [57]. Минерализация кости связана с особенностями гликопротеидов костной ткани и с активностью остеообластов. Различают грубоволокнистую и пластинчатую костную ткань. В грубоволокнистой костной ткани (преобладает у зародышей; у взрослых организмов наблюдается только в области черепных швов и местах

прикрепления сухожилий) волокна идут неупорядоченно. В пластинчатой костной ткани (кости взрослых организмов) волокна, сгруппированные в отдельные пластины, строго ориентированы и образуют структурные единицы, называемые остеонами.

Согласно морфологической модели, предложенной в [16], минералы располагаются в основном веществе внефибрилярно и внутрифибрилярно. В межфибрилярных пространствах объединения кристаллитов, прилегающие к коллагеновым фибриллам, окружают их, формируя манжетки, и контактируют с внутрифибрилярными объединениями. На отдалении от коллагеновых фибрилл кристаллиты образуют конгломераты, в которых они ориентированы в одном направлении. По отношению друг к другу эти конгломераты расположены под разными углами. Внутрифибрилярные объединения кристаллитов образуют ряд параллельных, спирально закрученных пластов, которые ориентированы под углом $8-25^\circ$ к оси фибрилл [16]. Отдельные объединения минералов связывают соседние пласты, обеспечивая непрерывность минерального компонента фибрилл после удаления органической составляющей.

Спиральная организация коллагеновых молекул. Три левозакрученные коллагеновые цепи, обвивая друг друга, образуют тройную суперспираль, закрученную вправо. Водородные связи между витками соседних цепей скрепляют их подобно застёжке-молнии на одежде, где каждое звено обладает минимальной прочностью, а все вместе – существенной. Шаг такой суперспирали составляет около 10 нм при толщине всего лишь 1.5 нм [16]. Столь высокая плотность укладки обусловлена наличием остатков глицина, радикал которого представлен атомом водорода и поэтому легко умещается внутри, тогда как радикалы остальных аминокислот обращены наружу.

Эта тройная спираль – главная отличительная черта молекулы тропоколлагена, являющейся структурной единицей всех типов волокнистых коллагеновых образований во внеклеточном матриксе [17, 22]. Рассмотрение трех последующих уровней организации волокнистых коллагеновых структур осуществлено ниже в одном подразделе, так как в аспекте настоящей работы принципиальные схемы их пространственной организации близки.

Спиральная организация микрофибрилл, фибрилл и коллагеновых волокон.

Микрофибриллы формируются путем латеральной агрегации 4-5 молекул коллагена с продольным смещением по отношению друг к другу на $1/4$ длины молекулы. В результате возникает характерный морфологический маркер – периодическая исчерченность. Это смещение вызвано тем, что аминокислоты по длине молекулы образуют четыре примерно одинаковые участка, где преобладают либо положительные, либо отрицательные заряды. Связываясь разноименно заряженными зонами, они смещаются относительно друг друга на указанную четверть длины молекулы.

В результате происходит изменение характера распределения совокупного заряда вдоль длинной оси микрофибриллы, что, в свою очередь, обеспечивает избирательность адсорбции гликозаминогликанов [16]. Фибриллы формируются путем интеграции микрофибрилл с помощью гликозаминогликанов. Диаметр фибриллы колеблется от 20 до 400 нм.

Периодичность, т.е. повторяемость одинаковых по устройству фрагментов структуры сохраняется на протяжении всей длины фибриллы. Последние окружены протеогликанами, адсорбированными по их поверхности [16, 23].

Волокна формируются путем агрегации фибрилл, контактирующих между собой за счет своих протеогликановых «оболочек», образующих «зоны контакта». Волокна имеют диаметр 500–20000 нм [16, 23]. Характерным признаком микрофибрил, фибрилл и волокон является их вытянутая спиральная форма. Особенно четко спиральность демонстрируется с помощью сканирующей электронной микроскопии [16, 23].

Структура минерального матрикса имеет четырехуровневую иерархическую организацию [24, 25]: первый уровень (внутренняя структура минерала); второй уровень (морфология минерала); третий уровень (копланарное объединение минералов) и четвертый уровень (макроструктурное объединение минералов в единый комплекс внутри каждого костного органа). При исследовании этой иерархической организации минерализованных структур используются два взаимно дополняющих друг друга методологических подхода – минералогический и медикобиологический. Специалисты в области минералогии используют в основном методы спектрального анализа и уделяют основное внимание внутренней организации минералов [26, 9, 27, 28, 29, 30], то есть структурам первого уровня. В медикобиологических исследованиях используются преимущественно различные микроскопические технологии позволяющие изучить морфологические и иерархические характеристики организации минеральных структур [16, 31, 32, 33, 34]. Этот подход преимущественно направлен на изучение второго и последующих уровней организации минерального матрикса. В настоящей работе будут объединены результаты обоих технологических направлений и поэтому первоначально оценим их разрешающую способность.

Минеральный матрикс.

Строение минерального матрикса костной ткани притягивает наше ос-

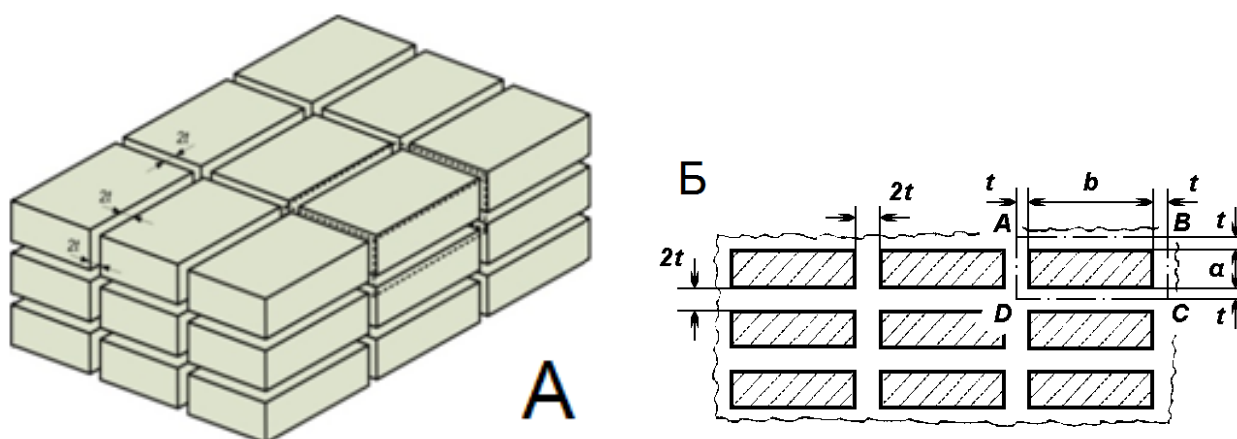


Рис. 2.1: Схематическая организация копланарного объединения[25, 3]. Обозначения: t – толщина гидратного слоя жестко связанного с поверхностью кристаллита; $2t$ – расстояние между двумя кристаллитами; a , b – толщина и ширина кристаллита соответственно; $ABCD$ – фрагмент, выделенный на рис. А пунктирной линией.

новное внимание в данной работе. Следуя работам [24, 2] наноструктуру минерального матрикса можно упрощенно представить в виде копланарного конгломерата, собранного из кристаллитов биоапатита, как это изображено на рис. 2.1(А). На рис. 2.1(Б) схематически показана геометрическая структура среза конгломерата. Видно, что кристаллиты (заштрихованные прямоугольники) отделены друг от друга разделительными слоями толщиной $d = 2t$, через t обозначена толщина слоя, связанного с отдельной поверхностью кристаллита.

Один из основных компонентов, образующих минеральный матрикс костной ткани – ГА (вариант фосфата кальция - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). На рис. 2.2 приведена кристаллографическая ячейка ГА, состоящая из 44 атомов[11].

Рисунок пояснен таблицами (Таб.1 а и б), в которых указаны дробные координаты атомов(а) ,межатомные расстояния(б), а также характеристики ЭЯ(а)[11]. Основным структурным элементом апатитов кальция

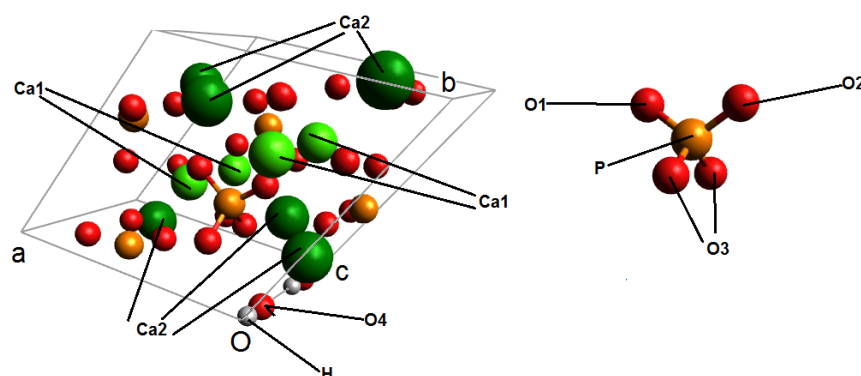


Рис. 2.2: Элементарная ячейка ГА. Отдельно показана структура аниона PO_4

являются тетраэдры PO_4 . Ионы Ca^{2+} занимают два кристаллографически разных положения. Этот факт имеет большое значение, поскольку способствует лёгкости протекания ионного обмена [15, 35, 26, 36]. В частности замечено, что в замещении ионами Sr^{2+} и Pb^{2+} намного активнее участвуют ионы $Ca2$ (показаны темно зеленым цветом на рис 2.2)[16]. Атомы $Ca1$, расположены в виде одноатомной колонны, перпендикулярной базовой плоскости, вдоль которой тетраэдры PO_4 связаны друг с другом с помощью атомов $O1$ и $O2$. Каждый атом $Ca1$ окружён с двух сторон плоскостями, параллельными базовой, одна из которых составлена тремя атомами $O1$, а другая тремя атомами $O2$.

Ионы $Ca2$ образуют каналы ориентированные вдоль оси с [11]. Через центры треугольников, образованных ионами $Ca2$ на $z = 1/4$ и $z = 3/4$, проходят ионы OH . Для биологических процессов, протекающих в кости, характерны замещения ионов Ca^{2+} на ионы K^+ , Na^+ и Mg^{2+} . Ясно, что замены на однозарядовые ионы калия и натрия требуют компенсации заряда, которая осуществляется путём замены PO_4^{3-} на CO_3^{2-} . Ещё одна особенность ГА, обеспечивающая ему столь важную роль в природе, это его способность сохранять группу симметрии $P6_3/m$ при возникновении

$a, b(\text{\AA})$	9.4302	P-O1:	1,537
$c(\text{\AA})$	6.8911	P-O2:	1,627
α, β, γ	90°, 90°, 120°	P-O3:	1,610
Ca1	1/3, 2/3, 0.0001	Ca1-O1:	2,405
Ca2	0.2466, 0.9904, 1/4	Ca1-O2:	2,489
P	0.3958, 0.3670, 1/4	Ca1-P:	3,604
O1	0.3305, 0.4872, 1/4	Ca2-O2:	2,258
O2	0.5946, 0.4772, 1/4	Ca2-O3:	2,300
O3	0.3241, 0.2423, 0.0696	Ca2-O4:	2,395
X	0.0, 0.0, 0.2980 (O4)	Ca2-P:	6,694
	0.0, 0.0, 0.4420 (H)	O4-H:	0.992

Таблица 1. Дробные координаты атомов в ячейке ГА

Таблица 2. Межатомные расстояния в А

примесей и вакансий.

Ионы в кристаллической решётке очень подвижны и структура самоорганизуется, что делает гексагональные апатиты чрезвычайно устойчивыми структурно [15, 26]. Благодаря высокой биосовместимости ГА хорошо взаимодействует с клетками костной ткани (остеоинтеграция) и нашёл широкое применение, в частности, в медицине в качестве материала для создания имплантов зубов и костей скелета. Однако такие существенные

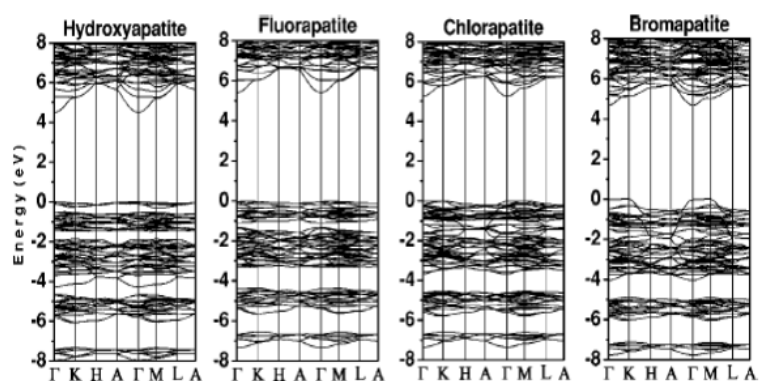


Рис. 2.5: Электронная структура апатитов[11]

его недостатки как, например, хрупкость, не позволяют изготавливать на его основе несущие конструкции скелета и он используется только в качестве материала для создания наполнителей и покрытий [41].

Электронная структура апатитов исследована достаточно детально. На рис. 2.5 приведены рассчитанные зонные структуры кристаллов ГА, фторапатита, хлорапатита и бромапатита [11].

Видно, что структуры всех апатитов очень похожи между собой и различаются только шириной запрещённой зоны и гладкостью потолка валентной зоны. Величина запрещённой зоны меняется от 4,51эВ для ГА до 5,47эВ для фторапатита. Для хлорапатита и бромапатита они составляют 5,27эВ и 4,71эВ соответственно. Для запрещённой зоны наблюдается тенденция к сужению по мере увеличения размера иона, располагающегося на оси *c*. Важно отметить, что теория приближения локальной плотности несколько приуменьшает истинное значение величины запрещённой зоны, поэтому истинные значения выше вычисленных.

Результаты расчетов, приведенные на рис. 2.6 показывают, что валентная зона образована несколькими подзонами, тесно связанными с отдельными электронными состояниями атомов [39]. Так, самая верхняя подзона в кристалле ГА образована электронными состояниями аниона OH^- . Анион гидроксильной группы обладает высокой подвижностью и во многом определяет сильную ионную проводимость ГА. В зоне проводимости отчетливо просматривается подзона, связанная со свободными *3d*-состояниями ионов *Ca*.

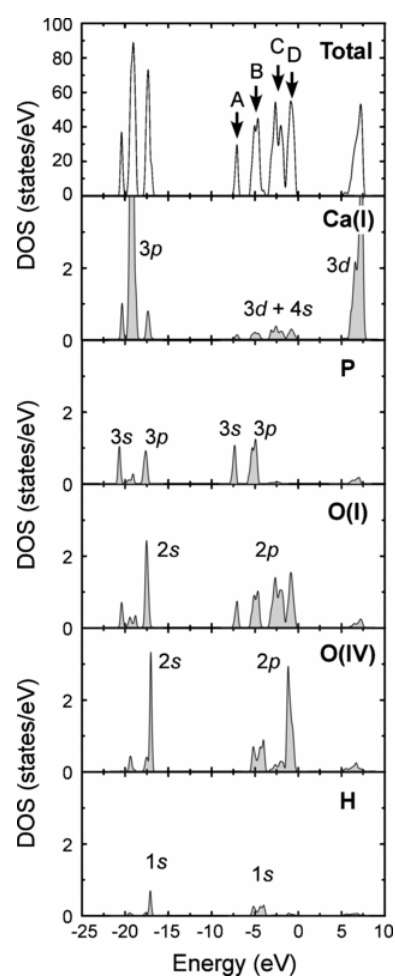


Рис. 2.6: Полные и парциальные кривые плотности состояний в валентной зоне гексагонального ГА

Глава 3

Теоретическая модель

3.1. Модель атомного строения копланарного конгломерата нанокристаллитов

Идеализированная модель копланарного конгломерата, образующего основу минерального матрикса кости, показана на рисунке 3.1. Кристаллиты (или нанокристаллиты) ГА на этом рисунке ориентированы определенным образом и разделены гидратным слоем, представляющим собой насыщенный водный раствор преимущественно ионов фосфата и кальция. Согласно многочисленным исследованиям, кристаллиты имеют форму параллелепипеда с размерами, меняющимися в пределах 7,0 нм- 15,8 нм по ширине, 13,0 нм- 37,3 нм по длине и 1,5 до 4,0 нм по ширине[3].

Отметим здесь, что кристаллитом называют твердое тело микронных или субмикронных размеров, представляющее собой трехмерную периодическую решетку из атомов, ионов или молекул, ограниченное замкнутой поверхностью, за пределами которой изменена или нарушена ориентация кристаллической решетки, либо находится газообразная, жидкая фаза или вакуум. Кристаллиты нанометровых размеров хотя бы в одном измерении называют нанокристаллитами. Заметим также, что в отличие от электронно-микроскопических исследований в рентгенодифракционных вместо термина «кристаллит» используется близкий по значению термин «область когерентного рассеяния» (ОКР)[42]. ОКР — область вещества, рассеивающая падающее излучение когерентно, т. е. так, что фаза падающего излучения однозначно определяет фазу рассеянного из-

лучения. Размер ОКР измеряется экспериментально на основании данных об уширении дифракционных отражений. Размер ОКР обычно на 10–15% меньше размера кристаллита, определяемого с помощью электронной микроскопии, поскольку ОКР соответствует его объему и не включает сильно искаженные границы.

Из рис. 3.1 видно, что конгломерат имеет вид 3-х мерной сверх-решетки из кристаллитов. Гидратная оболочка (или разделительный слой) представляет собой адсорбат и сцеплена с кристаллитами силами межмолекулярного притяжения. Ширина слоя, соотнесенная с одним кристаллитом, обозначена на рис. 3.1 через t . Благодаря этим силам раствор ионов создаёт ощутимое сопротивление растяжению и отрыву от кристаллитов. Таким образом гидратный слой обеспечивает целостность поликристаллического массива и, возможно, служит амортизатором механических напряжений для кристаллитов.

Жесткость и прочность костных структур определяются взаимосвязью органических и минеральных элементов, причём именно минеральный компонент придает жесткость и ударную вязкость костной ткани. Например, модуль упругости костной ткани в среднем в 4 раза меньше модуля упругости ГА, что означает существенно большую её податливость. Также заметно отличаются и пределы на сжатие и растяжение[2].

Атомная структура минерала ГА позволяет выделить кальциевые, фосфатные и гидроксильные каналы, которые формируются также в кристаллите. Фосфатные каналы образованы катионами фосфора, заключенными внутри слегка искаженной тетраэдрической клетки, образованной анионами кислорода. На рис. 3.1b изображен отдельный кристаллит ГА и его атомное строение, которое получено нами в предположении, что кристаллит является расширенной элементарной ячейкой ГА. На рис. 3.1с

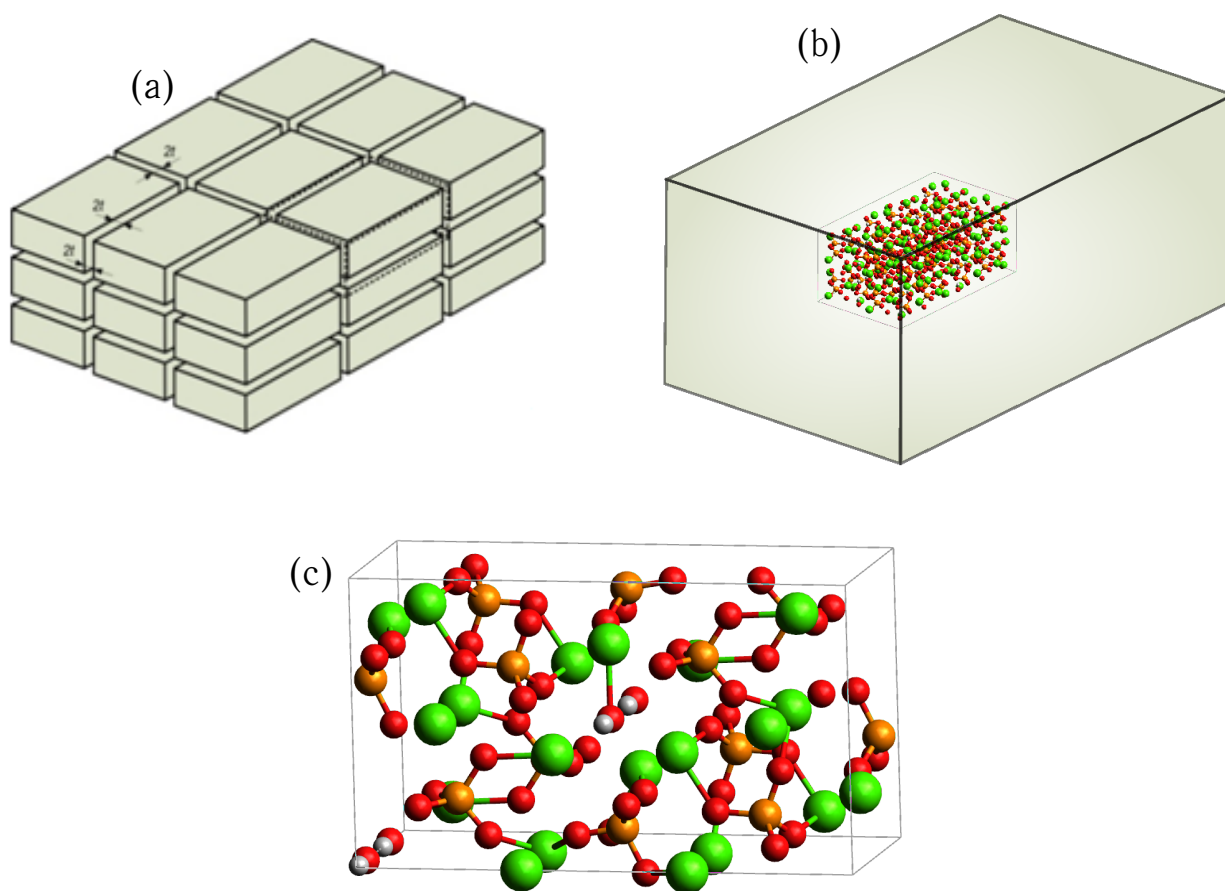


Рис. 3.1: Схема иерархической организации минеральных структур: а - копланарное объединение нанокристаллитов, разделенных гидратным слоем, б - отдельный кристаллит ГА и схематическое изображение атомной структуры кристаллита, в - кристаллографическая ячейка ГА в форме прямоугольного параллелепипеда.

показана кристаллическая ячейка ГА, построенная в форме параллелепипеда. Эта ячейка состоит из двух элементарных ячеек и обрезанных таким образом, чтобы обеспечить трансляционную симметрию кристалла [87]. Она имеет размеры $9,43 \times 16,33 \times 9,98 \text{ \AA}$. Эта ячейка использовалась при построении атомной структуры кристаллита, который, как видно из рис. 3.1, также имеет форму параллелепипеда.

Используя средние значения кристаллитов, находим, что, приблизительно, средний кристаллит содержит около 40000 атомов кальция, фосфора,

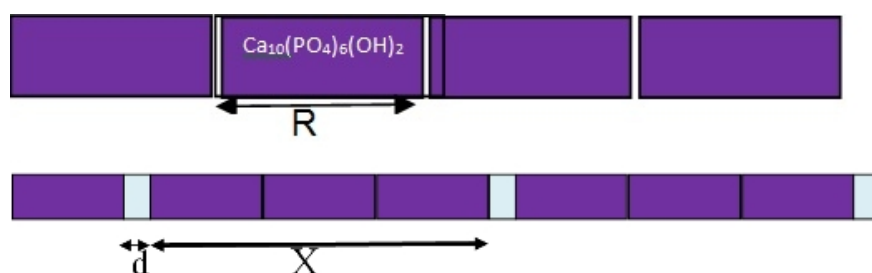


Рис. 3.2: Сверху - 1D-цепочка, звеньями которой являются расширенные элементарные ячейки кристалла ГА; R – размер ячейки; снизу - 1D модель для описания атомной и электронной структуры копланарного конгломерата кристаллитов ГА с учетом поверхностного слоя.

кислорода и водорода, и его можно представить в виде 820 элементарных ячеек. На всех приведённых рисунках приняты следующие обозначения: зеленые и оранжевые элементы соответствуют положению катионов кальция Ca и фосфора P , красные – анионов кислорода O , а серые – атомам водорода H . Положения катионов кальция и анионов фосфатных и гидроксильных групп OH указаны стрелками.

3.2. Модель электронного строения

Для описания электронной структуры кристалла ГА введём одномерную модель периодического потенциала. Представим кристалл ГА, размер которого X , в виде цепочки элементарных ячеек, размер которых R . Предположим, что $X \gg R$, и применим на этом основании для описания кристаллита циклические граничные условия. Будем использовать уравнения Хейне 3.1, связывающего электронно-оптические характеристики звена (а именно амплитуду прохождения T свободного электрона с кинетической энергией E) с электронной структурой цепочки[43]:

$$y^2 - 2Re(T^{-1})y + 1 = 0 \quad (3.1)$$

Его решения имеют вид $y_{1,2} = e^{\pm i\kappa R}$, где κ - квазиимпульс в периодическом потенциале цепочки. В тех случаях, когда $Re(T^{-1}) > 1$ - величина κ вещественна, решение уравнения имеет вид плоских электронных волн, распространяющихся вдоль рассматриваемой цепочки справа – налево и слева - направо. Когда $Re(T^{-1}) \leq 1$, то величина κ - мнимая и решения уравнения 3.1 –вещественные функции, имеющие вид экспоненциально затухающих и возрастающих волн $y_{1,2} = e^{\pm \kappa R}$.

Появление того или иного решения зависит от энергии электрона и определяется амплитудой отражения $T(k)$ от потенциала элементарной ячейки (или потенциала отдельного звена цепочки). Уравнение 3.1 определяет связь параметров ближнего и дальнего порядка в цепочке. Первые характеризуют структуру звена, а вторые период цепочки или периодичность решетки.

Анализ спектральной зависимости функции $Re(T^{-1})$ дает ответ на вопрос, где расположены электронные состояния. Они располагаются в запрещенной зоне, если $Re(T^{-1}) > 1$, или в зоне проводимости, если $Re(T^{-1}) < 1$. Функция $Re(T^{-1})$ имеет вид

$$Re\left(\frac{1}{T}\right) = \left|\frac{1}{\alpha}\right| \cos(kR + 2\tau) \quad (3.2)$$

Здесь α - модуль амплитуды прохождения через элементарную ячейку (звено), а τ - фаза электронной волны в системе координат с центром, помещенном в середину звена. В простейшем случае одноатомного звена цепочки модуль амплитуды и сдвиг фазы прошедшей волны могут быть представлены следующим образом:

$$\alpha = \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{w}{2k}\right)^2}}$$

$$\tau = -\arctan\left(\frac{w}{2k}\right)$$

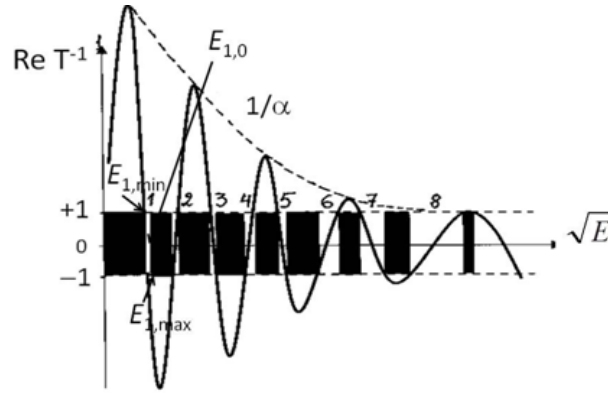


Рис. 3.3: Схематическое изображение возникновения запрещенных и разрешенных зон в цепочке в зависимости от амплитуды прохождения электрона сквозь звено цепочки

где w - мощность потенциала ячейки.

На рис. 3.3 приведена характерная зависимость реальной части функции $1/T$. Заштрихованные области отвечают запрещенным электронным состояниям в цепочке.. Не заштрихованные области отвечают разрешенным электронным состояниям, имеющим вид плоских волн, распространяющихся справа-налево и слева-направо в цепочке атомов.

Рассмотрим переход от энергетической зависимости величины $Re\left(\frac{1}{T}\right)$ к зонной структуре цепочки. Значения $E_{n,min}$, $E_{n,max}$ и $E_{n,0}$ на рис. 3.3 отвечают минимальной, максимальной энергии и положению средней энергии n -ой зоны разрешенных состояний в цепочке. Этим энергиям, как видно из рис. 3.3, отвечают значения функции $Re\left(\frac{1}{T}\right) = \pm 1$ и 0 , соответственно. Для минимума 1-ой зоны, $Re\left(\frac{1}{T}\right) = \pm 1$, уравнение 3.1 принимает простой вид

$$(y - 1)^2 = 0.$$

Следовательно, для дна первой разрешенной зоны находим $e^{i\kappa R} = e^{i0}$, т.е. энергии $E_{1,min}$ отвечает значение $\kappa = 0$ (см. рис. 3.4). Для вершины этой

зоны имеем

$$(y + 1)^2 = 0.$$

Откуда находим, что вершине отвечает условие $e^{i\kappa R} = e^{\pm i\pi}$ и, следовательно, она расположена при $\kappa = \pm \frac{\pi}{R}$. Для средней энергии зоны находим значения квазиимпульса $\pm \frac{\pi}{2R}$, при которых $\cos(kR + 2\tau)$ обращается в 0. В общем случае, зная энергетическую зависимость отдельного звена, можно найти дисперсионную зависимость $E(k)$, которая изображена на рис. 3.4. Простая дисперсионная зависимость получается в тех случаях, когда амплитуда T монотонным образом меняется с ростом κ . В тех случаях, когда звено образовано из нескольких атомов, в результате интерференции рассеянных на них электронных волн возможно возникновение сложной спектральной зависимости амплитуды T .

На рис. 3.2 (нижняя панель) схематически изображена модель 1D сверхцепочки, которая используется нами для описания электронной структуры копланарного конгломерата кристаллитов. Через X обозначена длина кристаллита, которая предполагается кратной размеру элементарной ячейки кристалла GA . Период квазицепочки определяется как $Q = d + X$, где d – сумма толщин гидратного и поверхностного слоя, в котором нарушена трансляционная симметрия кристалла GA .

Применим уравнение 3.1 для описания электронной структуры сверхцепочки, изображенной на рис. 3.2. Основная задача при использовании такого подхода заключается в расчете амплитуды T сквозь звено, которое содержит не только кристаллит, но и гидратный слой. Обозначим амплитуду прохождения электронной волны сквозь звено размером $d + X$ через T' . Эта амплитуда, как известно [46], выражается через амплитуды отражения b и B и прохождения t и T сквозь слой и кристаллит:

$$T' = \frac{tT}{1 - bBe^{ikR}} \approx tT \quad (3.3)$$

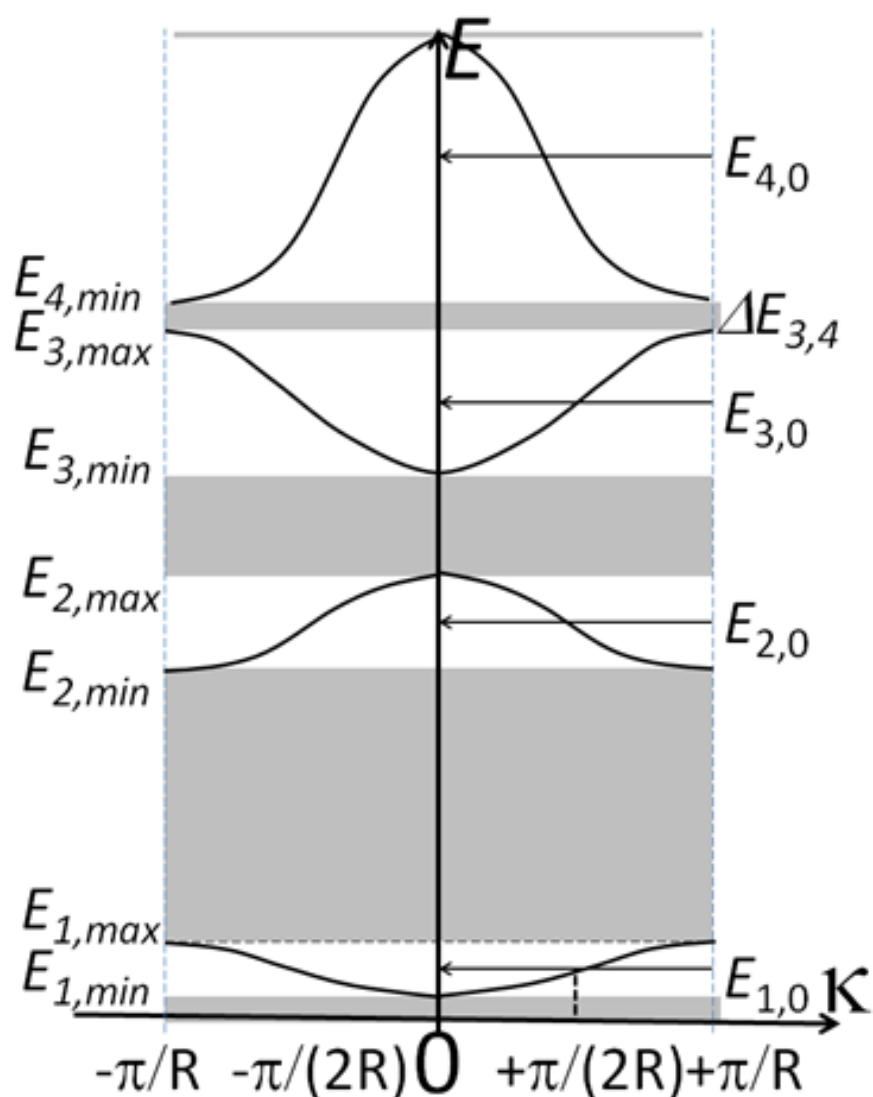


Рис. 3.4: Дисперсия зон, отвечающих спектральному ходу коэффициента $Re(\frac{1}{T})$ изображенному на рис. 3.3

Приближенное представление амплитуды T' в виде произведения амплитуд прохождения через кристаллит (или ЭЯ) T и гидратный слой (или разделительный слой) t (см. ур. 3.3) справедливо, в тех случаях, когда интерференция электронных волн отраженных от гидратного слоя и кристаллита мала. Из ур. 3.3 видно, что этот случай реализуется при условии малости амплитуд кратного отражения: $|bB| \ll 1$. В этом предположении

перепишем уравнение 3.1 в виде

$$z^2 - 2Re\left(\frac{1}{T'}\right)z + 1 = 0, \quad (3.4)$$

$$Re\left(\frac{1}{T'}\right) \approx Re\left(\frac{1}{tT}\right) = \left|\frac{1}{\alpha_0\alpha}\right| \cos(k(d+X) + 2\tau + \tau_0) \quad (3.5)$$

Соответственно, $z = e^{ik(d+X)}$. Рассмотрим случай, когда амплитуда прохождения сквозь разделяющий слой не испытывает заметного рассеяния. В предельном приближении, что разделительный слой – нерассеивающий, имеем $\alpha_0 = 1$, $\tau_0 = 0$. В этом приближении имеем

$$Re\left(\frac{1}{tT}\right) = \left|\frac{1}{\alpha}\right| \cos(k(d+X) + 2\tau) \quad (3.6)$$

Сделаем еще одно приближение, позволяющее связать с электронной структурой кристаллита с кристаллом ГА, а именно, будем предполагать применимость циклических условий для кристаллита, содержащего N кристаллических ячеек. Тогда, ур. 3.6 перепишем в виде

$$Re\left(\frac{1}{tT}\right) = \left|\frac{1}{\alpha}\right| \cos(kR + 2\tau) \cos\left(\frac{kd}{N} [1 - \tan(kR + 2\tau) \tan\left(\frac{kd}{N}\right)]\right) \quad (3.7)$$

Функции в квадратных скобках в ур. 3.7 характеризуют влияние пустого (мало рассеивающего) слоя шириной d . Обратим внимание, что $d = 2t$ в обозначениях главы 2. Обозначим

$$Re\left(\frac{1}{tT}\right) = \left|\frac{1}{\alpha}\right| \Xi(k) \cos(kR + 2\tau) \quad (3.8)$$

Функция влияния пустого промежутка на зонную структуру или функция конгломерата определена следующим образом:

$$\Xi(k) = \cos\left(\frac{kd}{N}\right) - \tan(kR + 2\tau) \sin\left(\frac{kd}{N}\right) \quad (3.9)$$

Легко увидеть, что при $d \rightarrow 0$ или $N \rightarrow \infty$ функция влияния $\Xi(k) \rightarrow 1$ и мы возвращаемся к ур. 3.1 и к электронной структуре 1D-цепочки апатита.

Используя полученные формулы, рассчитаем изменения в электронном строении конгломерата в зависимости от ширины разделительного слоя. В предположении, что $\frac{kd}{N} \ll 1$, то из 3.8 и 3.9 следует

$$Re\left(\frac{1}{tT}\right) = \left|\frac{1}{\alpha}\right| \sqrt{1 + \left(\frac{kd}{N}\right)^2} \cos(kR + 2\tau + \gamma), \quad (3.10)$$

где $\gamma = \arctan\left(\frac{kd}{N}\right) \approx \frac{kd}{N}$ Если условие $\frac{kd}{N} \ll 1$ не выполняется, то

$$Re\left(\frac{1}{tT}\right) = \left|\frac{1}{\alpha}\right| \cos(kR + 2\tau + \gamma), \quad (3.11)$$

где $\gamma = \frac{kd}{N}$ Принимая во внимание, что условие $\cos(k_{0n}R + 2\tau) = 0$, дает энергию центра узкой разрешенной зоны в цепочке (см. рис. 3.3), видим, что появление разделительного слоя ведет к появлению дополнительной фазы γ , которая вызывает спектральный сдвиг зоны:

$$\cos\left(k_{0n}R + \delta kR + 2\tau + \frac{kd}{N}\right) = 0.$$

Откуда находим $\delta k = -\frac{kd}{NR}$ и энергетический сдвиг центра п-зоны

$$\delta E^{(n)} \approx -\frac{2k_{0n}^2 d}{NR} \quad (3.12)$$

Сдвиг $\delta E^{(n)}$ направлен в сторону меньших энергий, прямо пропорционален ширине слоя и обратно пропорционален размеру кристаллита. Аналогичным способом можно рассчитать сдвиги краев узкой зоны. Пренебрегая, по-прежнему, резонансными эффектами между кристаллитами, но учитывая рассеяние электрона внутри разделительного слоя, из ур. 3.12 находим величину сдвига зоны

$$E_{assembly}^{(n)} - E^{(n)} \equiv \delta E^{(n)} \approx E^{(n)} \frac{\tilde{d}}{\langle L \rangle} \quad (3.13)$$

где \tilde{d} - электронно-оптическая ширина разделительного слоя $\tilde{d} = d + \frac{\tau_0}{k_{0n}}$, E^n и $E_{assembly}^n$ - центры п-зоны в кристалле и в конгломерате соответственно, а $\langle L \rangle$ - средний размер нанокристаллита.

Соотношения 3.12 и 3.13 показывают, что в рамках построенной модели переход от кристалла апатита к конгломерату ведет к низкоэнергетическому сдвигу узкой зоны разрешенных состояний. Помимо этого сдвига в рамках данной модели можно ожидать сужение ширины зоны, т.к. множитель перед косинусом в ур. 3.6 возрастает при появлении рассеивающего разделительного слоя.

Для проверки полученных аналитических соотношений были проведены численные расчеты изменений дисперсии зон копланарного конгломерата кристаллитов по сравнению с исходным кристаллом. На основе решения ур.3.1 получены модельные зависимости изменения закона дисперсии зон при введении пустого разделительного слоя в кристаллическую решетку. На рис. 3.5 приведены результаты модельных расчетов дисперсии двух зон для идеального кристалла (пунктир) и копланарного конгломерата (сплошная линия). В полном согласии с нашими ожиданиями видим, как возникновение ожидаемого низкоэнергетического конгломерат-кристаллического сдвига, так и сужение энергетических зон в конгломерате. Полученные результаты существенно зависят от энергий зон в кристалле и от геометрического отношения d/X .

Переход от одномерной цепочки к трехмерной решетке может быть также осуществлен на основании решений ур. 3.1, в котором κ и R заменены на соответствующие вектора в обратном и прямом пространствах. Если кристаллит в копланарном конгломерате представить в виде квантовой точки, то получим орторомбическую сверхрешетку с базисными векторами $b_j = d + L_j$, где $j = x, y, z$, а L_j - средний размер кристаллита в данном

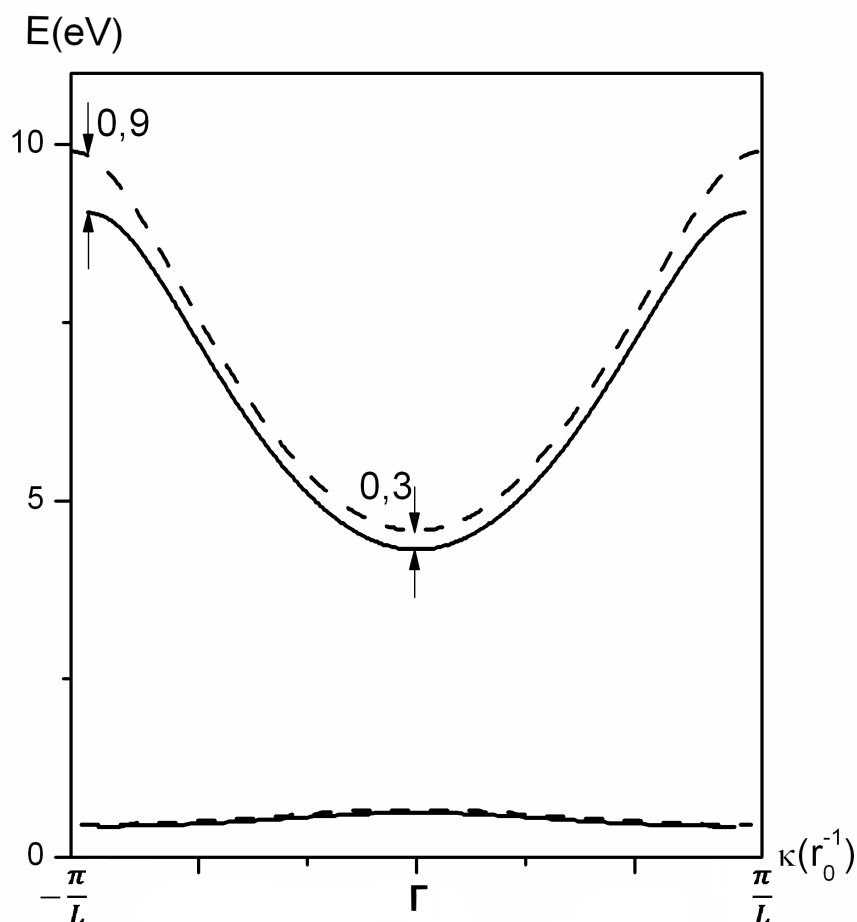


Рис. 3.5: Модельные расчёты зонной структуры конгломерата нанокристаллитов в присутствии пустого разделительного слоя (сплошная линия) и в приближении $d \rightarrow 0$ (пунктирная линия).

направлении. Учитывая результаты раздела 3.1, получим усредненные значения базисных векторов сверхрешетки равными 22.0, 9.5 и 5.5 нм. На рис. 3.6(a) изображена приведенная зона Бриллюэна для указанной сверхрешетки и показаны ее особые точки и направления. В качестве иллюстрации на рис. 3.6(b) показана дисперсионная зависимость зоны в 3D сверхрешетки минерального матрикса костной ткани, рассчитанная на основании решения трехмерного уравнения 3.1.

Полученные результаты указывают, что в рамках предложенной модели, появление разделительного слоя должно приводить к низкоэнер-

гетическому сдвигу электронного перехода из внутренней электронной оболочки атома в незаполненное квазистационарное состояние в зоне проводимости. Это означает, что энергии рентгеновских переходов в конгломерате будут смещены в сторону меньших энергий по сравнению с соответствующими переходами в кристалле ГА. Помимо спектрального сдвига можно ожидать уменьшение спектральной ширины этого перехода в БТС РСП конгломерата по сравнению с его шириной в кристалле апатита.

Используя формулу 3.13, результаты зонных расчетов ГА, приведенных на рис. 2.5, и средние значения размеров кристаллита и разделительного слоя (13 – 20 Å), оценим сдвиг плотности парциальных состояний в 3*d*-подзоне в сторону меньших энергий при переходе от монокристалла ГА к копланарному конгломерату. Выбирая положение дна зоны проводимости за нуль отсчета кинетической энергии электрона, мы имеем

$$\Delta E_{3d} \approx 2eV \times 2nm/10nm = 0.4eV$$

Использовано наибольшее значение ширины разделительного слоя, т.к. размеры нанозаэментов, получаемые при использовании дифракционных методов, больше соответствуют приближениям используемым при выводе ур. 3.12 и 3.13. Конечно, это очень грубая оценка. Тем не менее, она показывает, что, например, сдвиг энергии $Ca^{2+}2p \rightarrow 3d$ рентгеновского перехода в костной ткани под влиянием разделительного слоя будет заметно меньше энергии этого перехода в монокристалле ГА или в высушенной кости. Оценка дает нам все основания, что этот красный сдвиг «белой линии» в БТС РСП нативной кости можно экспериментально обнаружить. Природа этого сдвига имеет квантовый характер, но, приближенно, его можно связать с увеличением объема, приходящегося на один ион, в копланарном конгломерате кристаллитов по сравнению с

кристаллом ГА. Конечно, это очень упрощенное объяснение.

Обратим внимание, что предсказанный красный сдвиг энергий электронных переходов в костной ткани тесно связан с ее иерархической организацией. Например, по данным атомной силовой микроскопии изолированные минералы, извлеченные из молодой постнатальной бычьей кости имели средний размер $9 \times 6 \times 2$ нм и оказались значительно короче и толще чем измеренные, тем же методом аналогичные образцы, полученные из зрелой бычьей кости [88]. Хрупкие кости старых животных или животных с остеопорозом содержат относительно большие и однородные по размеру кристаллиты, в то время как более прочные молодые кости включают смесь недавно сформированных маленьких и созревших больших кристаллитов [89]. Из сказанного выше следует, что величина спектрального сдвига и изменения формы линий в спектрах поглощения будут зависеть от биологического состояния костной ткани.

В рамках 3DSL-модели можно рассмотреть другой предельный случай: разделительные слои в конгломерате представляют собой не пустые промежутки, а, наоборот, полностью непроницаемые барьеры. В этом случае сдвиг зоны и ее ширина стремятся к нулю. Таким образом вместо смещенной линии в БТС РСП костной ткани мы ожидаем появление несмещенного квазидискретного состояния.

В заключении раздела 3 подчеркнем, что использование электронно-оптических характеристик (например, амплитуды прохождения T) для описания электронной структуры минерального матрикса открывает возможности использования ур. 3.1 для описания нанокристаллитов биоапатита с нарушенной атомной структурой и нарушенным элементным составом, а также гидратных слоев с неупорядоченным распределением атомов. В общем случае такой подход открывает путь к изучению элек-

тронной структуры трехмерной сверхрешетки, составленной из "черных ящиков в мутной воде".

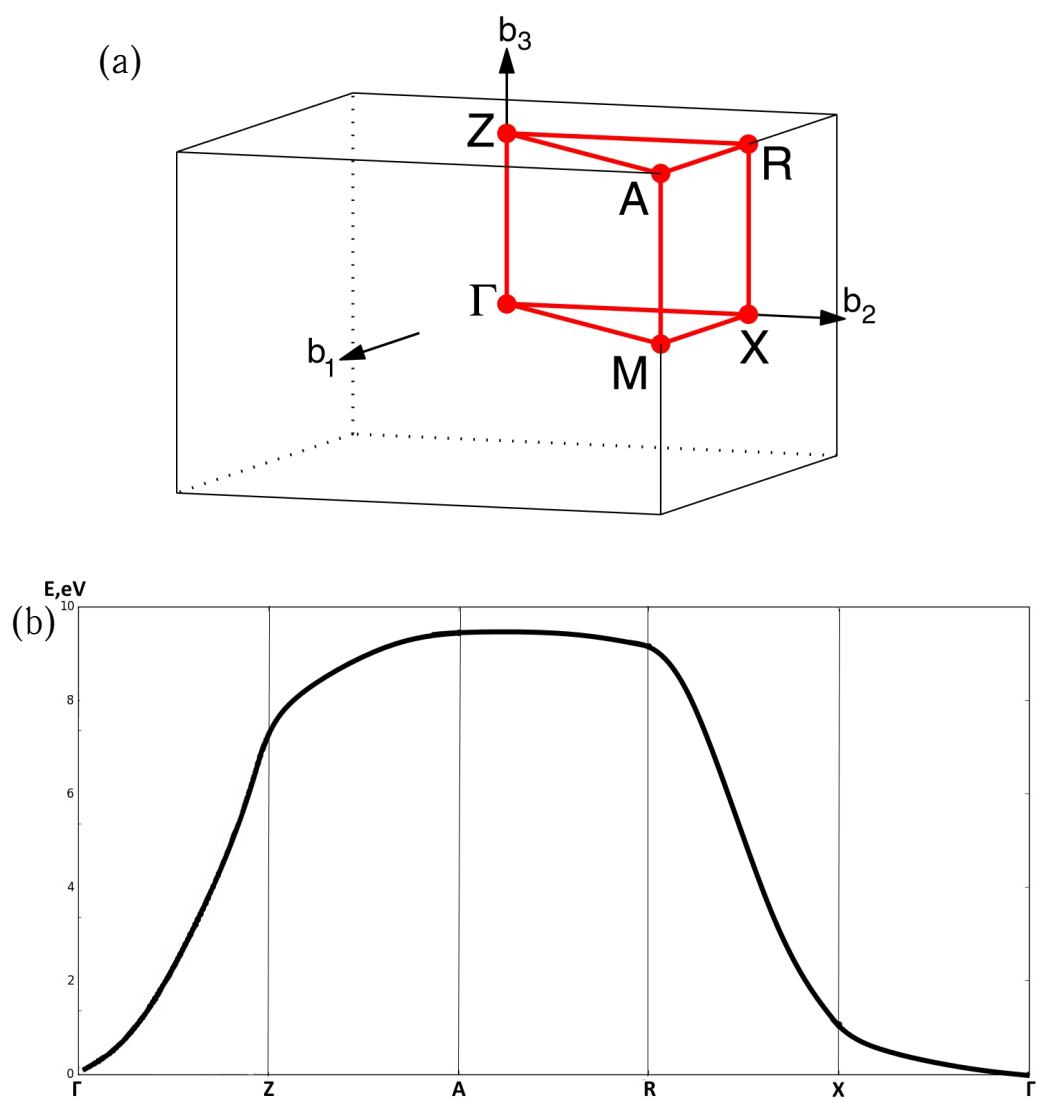


Рис. 3.6: а - Приведённая зона Бриллюэна для орторомбической решётки; б - Дисперсионная зависимость для 3D-сверхрешётки минерального матрикса.

Глава 4

Экспериментальные результаты

4.1. БТС РСП костной ткани вблизи $Ca\ 2p$, $P\ 2p$ и $O\ 1s$ порогов ионизации

Для проверки полученных в главе 3 предсказаний об особенностях электронного строения костной ткани и наблюдения иерархического эффекта были проведены измерения БТС РСП вблизи $Ca\ 2p$, $P\ 2p$ и $O\ 1s$ порогов ионизации костных тканей с высоким разрешением. В качестве образцов были использованы костный порошок и пластинки кости. Костные образцы были получены из кортикального слоя средней трети бедренных, большеберцовых и плечевых костей белых беспородных крыс-самцов массой 180-220 г. Кортикальный слой был тщательно очищен от мягких тканей, промыт в физиологическом растворе, высушен фильтровальной бумагой. Кости были разрезаны на тонкие пластины размером $15 \times 10\text{ мм}^2$ или растолчены в порошок со средним размером частиц $\approx 1\text{ мкм}$.

Измерения БТС РСП костного порошка были проведены с использованием синхротронного излучения на канале D1011 накопительного кольца MAX II (лаборатория MAX IV, Lund University, Швеция) [62]. Образцы были приготовлены *ex situ* на воздухе путём втирания порошка в рифлёную поверхность медных пластин размером $5 \times 5\text{ мм}^2$. Поверхность подложки была очищена механически и в звуковой этаноловой ванночке. Все измерения спектров поглощения были проведены в условиях сверхвакуума при давлении в измерительной камере $\approx 10^{-9}$ мбар. Образцы были размещены под углом $\approx 45^\circ$ к падающему монохрома-

тическому пучку. Размер фокусного пятна составлял $\approx 1 \times 1$ мм². БТС РСП вблизи $Ca2p$, $P2p$ и $O1s$ порогов поглощения были измерены методом полного электронного выхода (ТЕУ). Известно, что электронный выход при околопороговых энергиях пропорционален сечению поглощения [63, 64]. Спектры снимались по измерению тока утечки с образца с глубиной проникновения > 10 нм. Спектры поглощения были записаны с разрешением 50 мэВ в случае Р 2р порога (энергия фотонов $h\nu \approx 140$ эВ), 100 мэВ в случае $Ca2p$ порога edge ($h\nu \approx 350$ эВ) и 200 мэВ в случае О 1s порога ($h\nu \approx 535$ эВ). Спектры были нормированы на падающий поток, снятый с чистой золотой сетки, размещённой перед образцом. Калибровка энергии фотонов $h\nu$ производилась по первому узкому пику $F1s$ и $Ti2p_{3/2}$ спектров поглощения кристаллического K_2TiF_6 ($F1s \rightarrow t_{2g}$, 683.9 эВ и $Ti2p_{3/2} \rightarrow t_{2g}$, 459.0 эВ [47], а также по $C1s$ спектру поглощения C_{60} ($C1s \rightarrow LUMO$, 284.5 эВ [65]), соответственно.

Измерения БТС РСП пластин кости были проведены с использованием оборудования на канале UE56/2 PGM источника синхротронного излучения BESSY II в Helmholtz-Zentrum Berlin с использованием s-поляризованного излучения [66, 67]. Спектры были сняты методом ТЕУ в токовом режиме. Образцы были размещены под углом $\approx 45^\circ$ к падающему монохроматическому пучку. В качестве детекторов излучения использовались $GaAsP$ диоды с Keithley 617 электрометром в качестве измерителя тока. Эффективность детекторов была учтена. Калибровка абсолютной энергии произведена по N_2 линиям и по порогам поглощения железного фильтра в первом и высших порядках дифракции. Разрешение было выше, чем $E/\Delta E = 3000$, при точности энергетической шкалы ≈ 10 мэВ.

Во время измерений не было зарегистрировано зарядки образца и

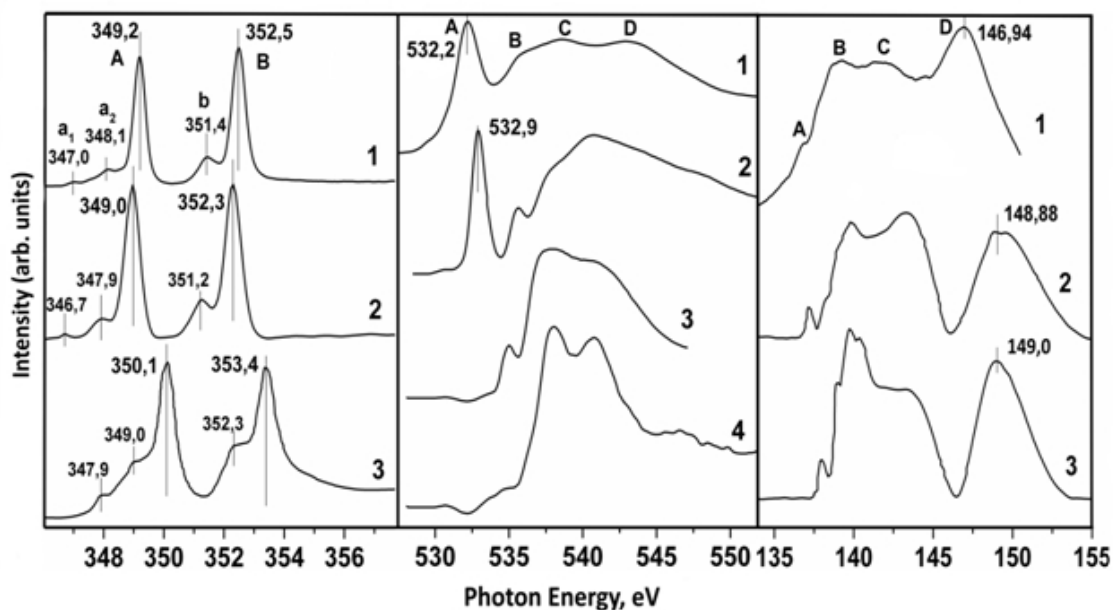


Рис. 4.1: Левая панель: $Ca2p$ спектры полощения костного порошка (1), фрагмента кости (2) и ГА(3) [1]. Центральная панель: $O1s$ спектры полгощения костного порошка (1), (2) – (4) относятся к иссушенной кости [1], жидкой воде [68] и ГА [1]. Правая панель: $P\ 2p$ спектры поглощения порошка нативной кости (1), прогретой кости ($400^{\circ}C$)(2) и ГА(3) [1]. На каждой панели спектры нормализованы на интегральную площадь для лучшего сравнения.

эффектов разложения, связанных с интенсивным мягким рентгеновским излучением как для костного порошка, так и для пластинок кости. Спектры были сняты несколько раз с разных точек образца, и показывали хорошую воспроизводимость.

4.1.1. Ca 2p

На рисунке 4.1 (левая панель) представлена БТС РСП вблизи $Ca2p$ порога ионизации костного порошка и пластинок кости, кривые 1 и 2 соответственно. Для сравнения там же представлен оцифрованный спектр ГА, взятый из работы [1] (кривая 3). Хорошо видны как их

сходство, так и отличия. Схожесть определена наличием интенсивных линий А и В наряду со слабыми пиками a_1 , a_2 , и b . Эти резонансы можно отнести к расщеплению мультиплета электронной конфигурации $Ca^{2+} 2p^5 3d^1$ в слабом кристаллическом поле. Мультиплетная структура этой конфигурации в октаэдрическом поле детально рассмотрена в [44]. В то же время, низкоэнергетический сдвиг пиков А и В ≈ 1 эВ по сравнению с ГА представляет собой отличительную особенность БТС РСП костной ткани. Учитывая, что релаксация дырки на $Ca 2p$ оболочке в кости и ГА почти одинаковая, мы заключаем, что парциальная плотность $Ca^{2+} 3d$ состояний в кости также смещена в сторону меньших энергий по отношению к $3d$ подзоне в кристалле ГА. Анализ формы пиков на кривых 1 и 3 на левой панели рисунка 4.1 показал, что полуширины (FWHM) линий А и В составляют соответственно 0,48 и 0,56 эВ в нативной кости, тогда как в ГА их значения равны 0,60 и 1,19[1]. Таким образом, экспериментальные исследования спектров фотопоглощения вблизи $Ca 2p$ -края подтверждают предсказанные в рамках 3DSL модели изменения в электронной структуре минерального матрикса костной ткани по сравнению с зонной структурой кристалла ГА. Это позволяет нам связать их со сверхпериодичностью решётки и, соответственно, с влиянием иерархической организации костной ткани.

Наблюдаемый существенный низкоэнергетический сдвиг ≈ 1 эВ, зарегистрированный для энергий $Ca 2p_{1/2,3/2} \rightarrow 3d$ переходов в нативной кости по отношению к ГА, является довольно удивительным явлением. В частности, можно предполагать неточную калибровку спектров ГА в работе [1]. Для дополнительной проверки величины сдвига спектральные позиции линий А и В в нативной кости, кривые 1 и 2 на левой панели рис. 4.1, были сравнены с энергиями переходов в ГА, усреднёнными

по результатам нескольких работ [1, 40, 69, 70]. Усреднённое значение сдвига $\langle \delta E_{3d} \rangle \approx 0.6 \text{ эВ}$ находится в удовлетворительном согласии со значением, предсказанным в рамках предложенной модели.

Недавно проведенные экспериментальные измерения БТС РСП вблизи $\text{Ca}2p$ порога костной ткани арктических рыб [86] подтвердили существование низкоэнергетического сдвига, величина которого около 0.2 эВ . Достоинством указанной работы является измерение БТС РСП костных тканей и минерала ГА в одинаковых экспериментальных условиях.

4.1.2. O 1s

На рисунке 4.1 (центральная панель) показана измеренная БТС РСП порошка нативной кости (кривая 1). Данный спектр сравнивается со спектром кости, иссушенной с помощью потока сжатого воздуха (кривая 2), ГА (кривая 4), измеренным в работе Rajendran [1], и жидкой воды (кривая 3), приведённым в работе Сарра et al. [68]. Хорошо видны существенные различия между этими спектрами. Мощная и довольно узкая линия А при 532.2 эВ и составная широкая полоса В-С-Д, начинающаяся при 535 эВ и растягивающаяся до 550 эВ выделяются на спектре нативной кости. Анализируя БТС РСП на рис. 4.1 (центральная панель), видим, что полоса А присутствует на спектрах как нативной, так и иссушенной кости, сильно подавлена в спектре кости прогретой при 400°C , и полностью отсутствует в спектре ГА [1]. БТС РСП вблизи $\text{O}1s$ порога ионизации прогретой кости демонстрирует близкую схожесть со спектрами ГА, CaCO_3 и $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [1, 71]. Так как нагревание кости до температуры выше 200°C приводит к исчезновению воды в межкристаллитном слое, линию А можно отнести к поглощению атомами кислорода в гидрантных слоях. Это заключение подтверждается исследованиями

ИК спектров костных тканей (например, [72, 73]), которые показывают, что нагревание свыше 200°C приводит к подавлению широкой полосы поглощения, расположенной около 3400 см^{-1} , тесно связанной с $\text{O} - \text{H}$ колебаниями. Обратим внимание, что низкоэнергетическая линия поглощения в спектре жидкой воды появляется только при 535 эВ [68]. Таким образом, линия А не может быть напрямую отнесена к рентгеновским переходам в межкристаллитной воде.

Чтобы понять природу линии А, примем во внимание фундаментальные особенности взаимодействия ионов и воды [74, 75]. В этом случае линия А может быть связана с $\text{O}1s$ поглощением гидроксильным анионом OH^- в водном растворе [76, 77, 78]. При добавлении KOH или NaOH к воде появляются новые детали спектра при 532.5 эВ [78] и 532.8 эВ [77] соответственно. Сарра с соавторами [78] связали низкоэнергетическую структуру с основным $\text{O}1s$ переходом в анионе $\text{OH}^-(\text{H}_2\text{O})_m$. Ожэ-электронная спектроскопия [77] подтверждает эту связь. Согласно расчётам, проведённым в [78], анион OH^- заключен внутри сольватной сферы. Линия А также может быть связана с $\text{O}1s$ поглощением квазимолекулярным фрагментом $\text{Ca}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_n$. Поскольку электронные структуры кластеров $\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_n$ и $\text{Ca}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_n$ очень похожи, можно предположить резонансное поведение линий поглощения при 532 эВ в $\text{Ca}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_n$. Такое поведение может быть вызвано или эффектом сверхрешётки на молекулы воды в гидрантных слоях, или адсорбцией воды на поверхность кристаллитов. Во-вторых, линия А может быть связана с $\text{O}1s$ поглощением в молекулах коллагена. Теоретические и экспериментальные исследования [79, 83, 82, 81, 80, 92] показывают, что $\text{O}1s \rightarrow \pi^*$ переходы в карбоксильных группах ($\text{O} - \text{C} = \text{O}$), H_2CO и $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, а также в пептидах расположены в окрестности $530.8\text{--}532.3\text{ эВ}$. В-третьих, в формирование по-

лосы A вносят вклад $O1s \rightarrow \pi^*$ переходы в $[PO_4]^{2-}$ или $[PO_4]^-$ кластерах с ненасыщенной $P - O$ связью [71].

На основании проведенного рассмотрения можно сделать вывод, что, мощный резонанс при 532.2эВ (рис. 4.1 центральная панель, кривая 1) имеет сложную природу. Он может быть связан с ренгеновским поглощением в водном растворе или адсорбцией воды в гидрантных слоях и в коллагене. Выяснение его природы даст ключ к пониманию фундаментальных взаимодействий между водой в гидрантных слоях и коллагеном в костной ткани. Что касается широкой полосы $B - C - D$ на кривой 1, она, по всей видимости, определяется $O1s$ переходами в $[PO_4]^{3-}$, расположенных в кристаллитах и в гидрантных слоях. Иерархические эффекты основных структур этой полосы не обсуждаются в данной работе, в следствие их сложной природы.

4.1.3. P 2p

На правой панели рисунка 4.1 представлена БТС РСП вблизи $P2p$ порога поглощения порошка нативной кости (кривая 1), а также прогретой при $400^\circ C$ кости (кривая 2) и ГА (кривая 3), полученные в работе [1]. Сравнение приведённых спектров показывает их близкую схожесть, хотя резонансные структуры хуже проявляются в спектре нативной кости. БТС РСП определяется серией переходов из глуболежащих $P2p_{1/2,3/2}$ уровней на припороговые $a_1(P3s)$, $t_2(P3p)$ и квазисвязные уровни $e^*(P_{cd})$ и $t_2^*(P_{cd})$, пространственно локализованные внутри тетрагональной ячейки $[PO_4]^{3-}$ [85, 84]. Можно отметить их близкую схожесть с $Si2p$ спектрами изоэлектронных и изоструктурных SiF_4 молекул и $[SiO_4]^{2-}$ групп. $P2p_{3/2,1/2}e^*$ и t_2^* состояния, расположенные выше порога поглощения, обычно относят к резонансу формы (например [48]).

Исследование БТС РСП нативной и прогретой кости и ГА [1, 71] обеспечивает дополнительный инструмент исследования иерархических эффектов в электронной структуре костной ткани. Прежде всего, сравнение этих спектров ясно указывает на наличие красного сдвига. Рассматривая низкоэнергетическую полосу А на кривых 2 и 3, можно увидеть, что $P2p_{3/2} \rightarrow a_1(P3s)$ энергии перехода при 138.04эВ в ГА смещается до 137.15эВ в прогретой кости. Наблюдаемый сильный красный сдвиг $\delta E_{P3s} \approx 0.9\text{эВ}$ подтверждает его связь с эффектом сверхрешётки на зонную структуру ГА. Эта связь также подтверждается недавними исследованиями [48], где установлено, что в отличие от резонанса формы, припороговые состояния в молекулярных кристаллах, содержащих химически устойчивые молекулярные группы, показывают незначительную чувствительность к окружению возбуждаемого атома. К сожалению, измерения нативной кости (кривая 1 рис. 4.1, правая панель) не позволяют разрешить полосу А.

Красный сдвиг высокоэнергетической линии D, обычно относимый к $P2p \rightarrow t_2^*(P_{\epsilon d})$ резонансу формы, хорошо виден на рисунке. Сравнивая кривые 1 и 3, можно наблюдать иерархический красный сдвиг $\delta E_{P_{\epsilon d}} \approx 3.06\text{эВ}$.

Энергии перехода при 149.0эВ (кривая 3) в ГА меняется до 146.94эВ (кривая 1) в нативной кости. Рассматривая БТС РСП вблизи $P2p$ порога ионизации в разных соединениях, содержащих $[PO_4]^{3-}$ [84], можно увидеть, что энергии резонансов меняются значительно слабее, чем в последовательности костная ткань - ГА. Значительный сдвиг $\delta E_{P_{\epsilon d}}$ может быть объяснен с помощью уравнения 3.13. Принимая во внимание, что $P_{\epsilon d}$ состояния ГА располагаются намного выше, чем $Ca^{2+}3d$ состояния, относительно дна зоны проводимости, а отношение толщины разделительного

слоя к размерам кристаллита не изменяется, мы ожидаем увеличение величины красного сдвига. Так как релаксация $P2p$ вакансии почти такая же, как и в ГА, плотность $P3s$ и протяжённых ϵd состояний демонстрирует схожий красный сдвиг, по сравнению с теми же состояниями в ГА. Полуширина линии D не обсуждается здесь, так как $P2p \rightarrow t_2^*(P_{\epsilon d})$ переход троекратно вырожден и его изменения могут быть вызваны как уменьшением прозрачности сверхячейки, так и его расщеплением в следствие понижения точечной симметрии в сверхрешётке.

Экспериментальные исследования БТС РСП костных тканей арктических рыб [86] позволили разрешить низкоэнергетических переход $P2p_{3/2} \rightarrow a_1(P3s)$ и подтвердить существование красного сдвига по сравнению с энергией соответствующего перехода в ГА. Анализ экспериментальных данных дает величину сдвига 2.2эВ. Наблюдаемое увеличение сдвига согласуется с модельными представлениями главы 3 и может быть качественно объяснен на основании уравнения 3.13.

4.2. Температурные зависимости БТС РСП костных тканей

Для проведения более детальных исследований влияния иерархической организации на локальную электронную и атомную структуру костных тканей проведены исследования температурной зависимости БТС РСП костных тканей. Поскольку при нагревании костных тканей свыше 200°C межкристаллитная вода уходит, можно ожидать, что оптическая толщина разделительного слоя будет увеличиваться, т.к. этот слой будет эффективно приближаться к "пустому" слою. Для проведения этих измерений были приготовлены образцы двух типов описанным выше способом из

костей крыс разного возраста: 250-280г (взрослые) и 30-50 г (новорожденные) соответственно. В данных измерениях костный порошок смешивался с золотым, и полученная смесь спрессовывалась в таблетку. Прогрев при каждой фиксированной температуре проводился около 30 минут в диапазоне от комнатной температуры до 450°C в вакуумной камере. Измерения проводились на канале RGBL BESSY II. $\text{Ca}2p$ и $\text{O}1s$ спектры поглощения полученных образцов были измерены методом полного электронного выхода (TEY). Также были проведены измерения костного порошка, втёртого в золотую и танталовую фольги. Спектры были записаны с разрешением 78 мэВ в случае фотопоглощения $\text{Ca}2p$ -оболочкой и 140 мэВ в случае $\text{O}1s$ и нормированы на падающий поток. Калибровка $\text{Ca}2p$ и $\text{O}1s$ спектров поглощения в исследуемых образцах проводилась на основе измерений $\text{Au}4f_{7/2}$ фотоэлектронного пика, регистрируемого в 1-м и 2-м порядках дифракции, с использованием рентгеновского излучения 575 и 355эВ.

4.2.1. Ca 2p

При анализе $\text{Ca}2p$ спектров особое внимание следует уделить положению пиков и их форме. На рисунке 4.2 а представлены спектры образцов из костного порошка взрослых крыс, прогретых при разных температурах, и реперный спектр ГА. Хорошо видно, что при всех температурах наблюдается красный сдвиг пиков относительно ГА. Величина сдвига варьируется от $\approx 0,1\text{эВ}$ (216°C) до $\approx 0,3\text{эВ}$ ($280,360^{\circ}\text{C}$). Тенденция изменения величины сдвига полос А и В показана на рисунке 4.2 б и имеет сложный характер.

На рисунках 4.2 с, d представлена аналогичная информация для костей новорожденных крыс.

$T, ^\circ C$	Положение А	Положение В	Ширина А	Ширина В
20	349,08	352,38	0,67	0,69
50	349,06	352,30	0,47	0,53
60	349,14	352,30	0,42	0,47
90	349,16	352,37	0,55	0,65
103	349,11	352,38	0,41	0,56
173	349,15	352,36	0,76	0,69
180	349,15	352,36	0,47	0,53
216	349,20	352,48	0,53	0,63
280	349,01	352,38	0,69	0,79
360	349,01	352,38	0,91	0,75
450	349,16	352,35	0,66	0,90
ГА	349,27	352,58	0,46	0,51

Таблица 4.1: К рисунку 4.2 а. Значения даны в эВ

$T, ^\circ C$	Положение А	Положение В	Ширина А	Ширина В
20	349,18	352,48	0,54	0,68
50	349,11	352,44	0,43	0,48
75	349,05	352,37	0,54	0,68
110	349,13	352,44	0,58	0,63
180	349,18	352,46	0,66	0,55
250	349,18	352,46	0,51	0,60
400	349,09	352,37	0,66	0,69
ГА	349,27	352,58	0,46	0,51

Таблица 4.2: К рисунку 4.2 с. Значения даны в эВ

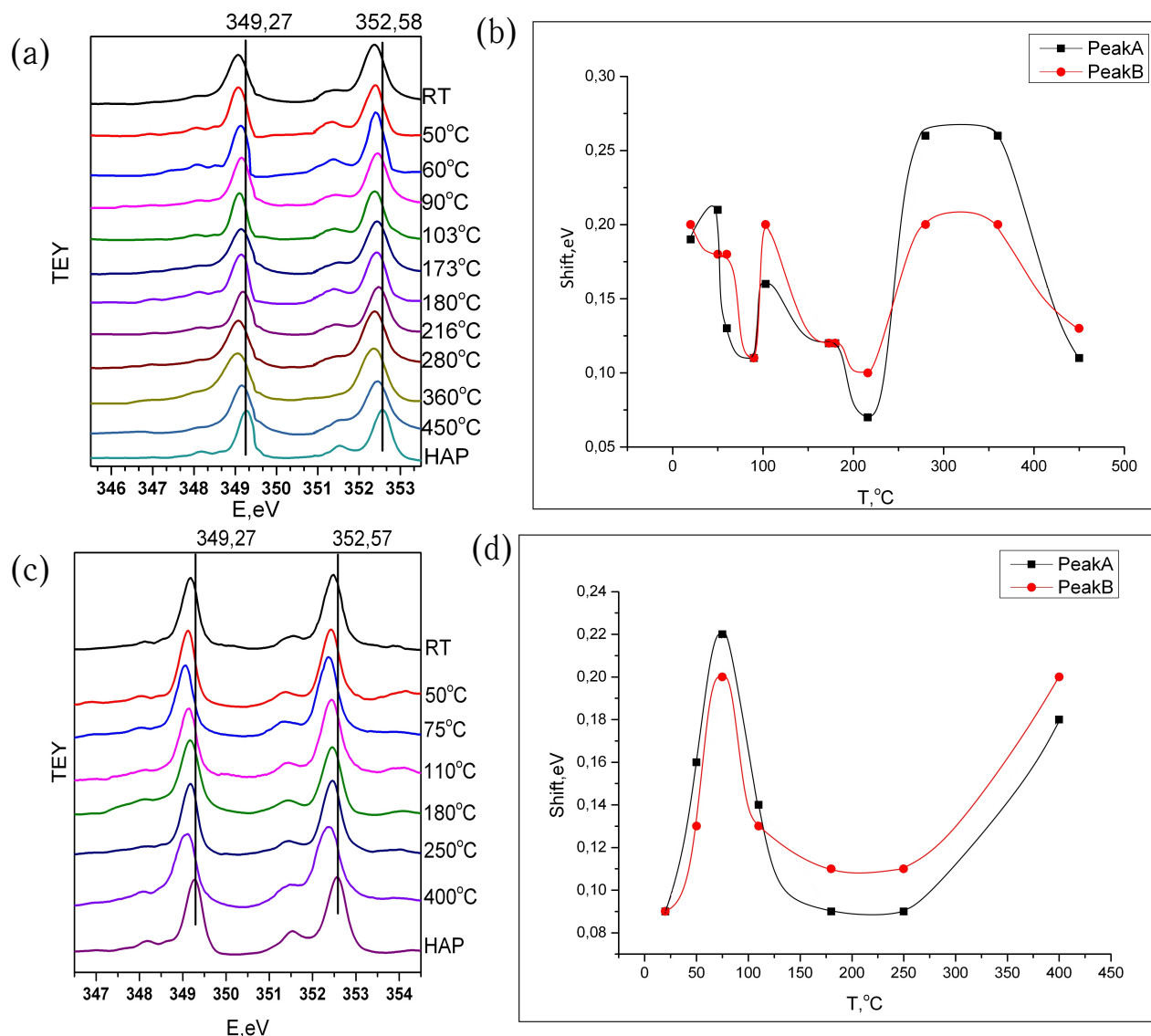


Рис. 4.2: а - Температурная зависимость Ca 2р спектров костей взрослых крыс относительно ГА; б - Температурная зависимость величин сдвигов А и В на $Ca2p$ спектрах костей взрослых крыс относительно ГА; в - Температурная зависимость Ca 2р спектров костей новорожденных крыс относительно ГА; г - Температурная зависимость величин сдвигов пиков А и В на Ca 2р спектрах костей новорожденных крыс относительно ГА

Полученные экспериментальные результаты позволяют сравнить эффект иерархической организации в костной ткани разновозрастных крыс. Известно, что размеры кристаллитов в костях взрослых животных в среднем существенно больше, чем у молодых [88, 89], дополнительной особенностью постнатальных костных тканей является большая аморфизация ГА в минеральном матриксе. Согласно предложенной модели, отношение размеров кристаллита и разделительного слоя играет определяющую роль как для величины сдвига, так и для формы линий.

Сравнительный анализ БТС РСП костных тканей в зависимости от температуры прогрева, представленных на рис. 4.2 а и 4.2 с, показывает, что во-первых для всех температур полосы А и В расположены при меньших энергиях чем в минерале, во-вторых энергетический сдвиг этих полос, их форма и ширина демонстрируют сложную температурную зависимость. Так, в изученном диапазоне температур ширина полосы А в БТС РСП зрелых крыс меняется от 0.41эВ до 0.91эВ , а полосы В от 0.47 до 0.90эВ . Эти спектральные изменения указывают на влияние иерархической организации костной ткани, поскольку наблюдаемые изменения формы и ширины резонансных полос не могут быть связаны с температурными изменениями фононных колебаний. С позиций 3DSL модели они обусловлены температурными изменением электронно-оптической толщины разделительного слоя. Сложный характер изменений сдвига и формы линий указывает, что удаление межкристаллитной воды при нагревании сопровождается повышением концентрации растворенных в ней ионов и вызывает сложные химические реакции и перестройку атомной структуры как в разделительном слое, так и на межфазовых границах нанокристаллитов. В результате этой перестройки возникают сильные изменения симметрии и величины потенциала окружения

ионов кальция в зависимости от их положения в гидратном слое и на межфазовой границе. Потенциалы окружения быстро меняются с ростом температуры и удалением межкристаллитной воды. Характеризация этих изменений не являлась задачей данной работы. Она требует проведения дополнительных исследований с использованием более широкого набора экспериментальных методов, в частности, ИК спектроскопии.

4.2.2. O 1s спектры

Исследования температурной зависимости БТС РСП костной ткани вблизи O1s порога ионизации направлены прежде всего на проверку гипотезы, высказанной в разделе 4.1 и в работе [91], что низкоэнергетическая полоса поглощения А связана с электронными переходами 1s оболочки атомов кислорода в гидратном слое минерализованной костной ткани.

При анализе O1s спектров мы обращаем основное внимание на относительную интенсивность пика А, предшествующего широкой полосе поглощения. Предполагается, что основной вклад в интенсивность пика А вносят анионы OH^- внутри сольватной оболочки, расположенные в разделительных слоях, а также молекулы коллагена. Если это предположение справедливо, то при повышении температуры примерно до $200^\circ C$ ожидается уменьшение интенсивности пика А вследствие удаления межкристаллитной воды. Известно, что после достижения температуры выше $200^\circ C$ межкристаллическая вода полностью выпаривается. Далее, при достижении более высоких температур (порядка $400^\circ C$) начинается разрушение белковых молекул, в результате чего пик А должен полностью исчезнуть, и спектр кости должен приблизиться к спектру ГА.

На рисунках 4.3 и 4.4 показана температурная зависимость O1s спек-

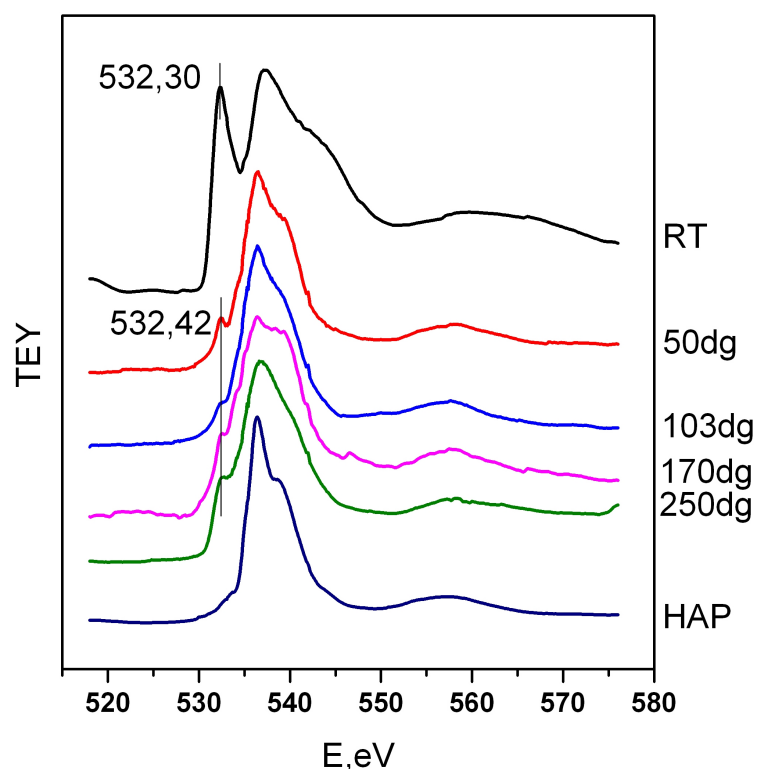


Рис. 4.3: Температурная зависимость $O1s$ спектров поглощения костей взрослых крыс

тров костей взрослых и новорожденных крыс. Измерения температурной зависимости БТС $O1s$ спектров поглощения костных тканей проводились тем же методом, что и БТС $Ca2p$ спектров. Результаты проведенных измерений подтверждают высказанную выше гипотезу о природе полосы поглощения А. Анализ спектров на рис. 4.3 показывает, что с ростом температуры интенсивность полосы А постепенно уменьшается. Ее интенсивность максимальна в БТС РСП при комнатной температуре и понижается при нагревании до $250^{\circ}C$ почти в 3 раза по сравнению с интенсивностью сложной полосы В – С, расположенной при больших энергиях. Обратим внимание, что относительные интенсивности элементов БТС РСП на рис. 4.3 и 4.4 несколько различаются при низких температурах. Но при $250^{\circ}C$ они практически совпадают. Поэтому температурную зависимость на рис. 4.3 можно расширить, включив в нее

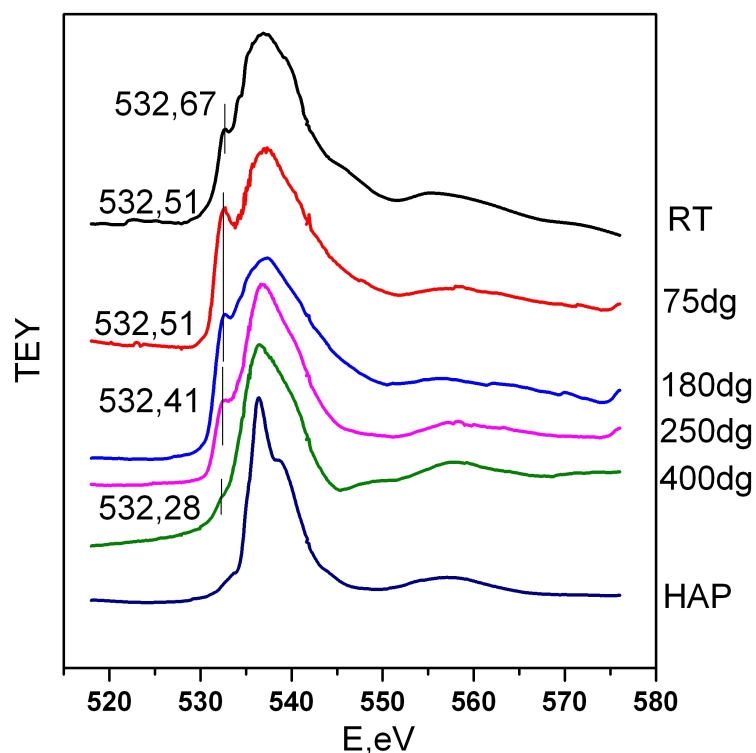


Рис. 4.4: Температурная зависимость $O1s$ спектров поглощения костей новорожденных крыс

спектр $O1s$ поглощения костной ткани при $400^{\circ}C$ из рис. 4.4. Тогда, в полном согласии с нашими ожиданиями происходит полное подавление интенсивности полосы А при нагревании нативной костной ткани до $400^{\circ}C$.

Обратим также внимание, что БТС РСП, измеренная в [91] при комнатной температуре вблизи $O1s$ порога ионизации в костной ткани и представленная на рис. 4.1, несколько отличается от приведенной на рис. 4.3. Чтобы понять возможную причину этих различий, прежде всего заметим, что вес крыс, используемых в измерениях в MAXLab [91] был меньше, чем в измерениях на BESSY II. Это означает, что в первом случае использовались более молодые крысы. Взаимосвязь БТС РСП костной ткани с ее возрастными изменениями подтверждается результатами исследований новорожденных крыс на рис. 4.4. Вторая причина – возможное

загрязнение органическими соединениями оптических элементов монохроматоров, используемых при измерении БТС $O1s$ абсорбционных спектров. Тем не менее, это не может повлиять на вывод о подавлении полосы А в спектрах поглощения с ростом температуры нагревания костной ткани и о природе фотопоглощения в окрестности этой полосы.

3DSL модель предсказывает увеличение объема, приходящегося на разделительные слои, по сравнению с объемом нанокристаллитов в минеральном матриксе. На этом основании можно было бы ожидать увеличение относительной интенсивности полосы А в спектрах костей новорожденных крыс. Однако, природа полосы А связана не собственно с поглощением в жидкой воде, а с насыщенностью раствора. Согласно [91], эта полоса определяется электронными переходами в ионе гидроксид-иона в окружении сольватной оболочки, а также в молекулах воды в ближайшем окружении ионов кальция и магния в растворе.

Глава 5

Основные результаты и выводы

В данной работе проведены систематические теоретические и экспериментальные исследования взаимосвязи иерархической организации костной ткани с ее электронной и атомной структурами.

1. Построена квантово-механическая 3DSL-модель электронной структуры минерального матрикса на основе совокупности морфологических представлений о строении костной материи. В рамках 3DSL-модели минеральный матрикс рассматривается как трехмерная сверхрешетка, образованная копланарным объединением нанокристаллитов ГА, разделенных гидратными слоями одинаковой толщины. Получены аналитические соотношения, связывающие электронную структуру копланарного объединения кристаллитов с зонной структурой кристалла ГА, и предсказаны эффекты влияния иерархической организации на электронную структуру минерального матрикса, в частности, красный сдвиг и изменения формы рентгеновских переходов в костной ткани относительно соответствующих положений и формы перехода в минерале ГА.

2. Проведены экспериментальные исследования БТС РСП вблизи $Ca2p$, $P2p$ и $O1s$ краев непрерывного поглощения нативной костной ткани с использованием синхротронного излучения и оборудования лабораторий MAXLab (Швеция), Polarimeter и RGBL BESSY II (Германия). Результаты сравнительного анализа энергий рентгеновских переходов в костной ткани и ГА подтвердили существование низкоэнергетического сдвига в минеральном матриксе костной ткани. Предложена интерпретация основных деталей БТС РСП вблизи $Ca2p$, $P2p$ и $O1s$ краев непрерывного поглощения нативной костной ткани, выявлена связь изменений БТС

РСП костной ткани с ее иерархической организацией. Высказано предположение, что низкоэнергетическая полоса вблизи $O1s$ края непрерывного поглощения преимущественно обусловлена рентгеновскими переходами в ионах гидроксила и молекулах воды в солевом растворе разделительного слоя.

3. Измерена БТС РСП нативной костной ткани вблизи $Ca2p$ и $O1s$ порогов в зависимости от температуры ее нагрева в интервале температур от комнатной до $450^{\circ}C$. Выявлена сложная температурная зависимость спектрального сдвига и формы интенсивных полос поглощения вблизи $Ca2p$ края. Анализ температурной зависимости подтвердил 1) связь низкоэнергетического сдвига с иерархической организацией костной ткани и 2) природы низкоэнергетической полосы в РСП вблизи $O1s$ края непрерывного поглощения в костной ткани.

4. Исследована БТС РСП вблизи $Ca2p$ и $O1s$ порогов ионизации нативной костной ткани разновозрастных крыс. Выявлены существенные возрастные изменения БТС РСП нативной кости и их связь с ее иерархической организацией.

Глава 6

Заключение

Проведенные теоретические и рентгеноспектральные исследования костной ткани показали перспективность рентгеновской абсорбционной спектроскопии и разработанной 3DSL модели для понимания взаимосвязи электронной и атомной структуры минерального матрикса с иерархической организацией костной ткани. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности проведения дальнейших рентгеноспектральных исследований 1) температурной зависимости электронной и атомной структуры воды, 2) возрастных изменений и 3) нарушений в электронной и атомной структуре костной ткани, возникающих при патологии ее развития. Привлечение методов ИК спектроскопии, поляриметрии и методов элементного анализа представляется крайне желательным для более глубокого понимания взаимосвязи электронного и атомного строения костных тканей с ее иерархической организацией. Чрезвычайно важным является развитие *in vivo* моделирования процессов взаимодействия рентгеновского излучения с костной тканью.

Список литературы

1. Jayapradhi Rajendran, Stefano Gialanella, Pranesh B. Aswath, XANES analysis of dried and calcined bones, *Materials Science and Engineering C* 33, 2013
2. Аврунин А.С., Мельников Б.Е., Паршин Л.К., О физической природе жёсткости и прочности костной ткани, *Научно-технические ведомости СПбГПУ, Наука и образование*, 3'2010
3. Avrunin A. S., Tihilov R. M., Shubniakov I. I. et al. Hierarchy of the skeleton structure organization. *Structural Relationships and Functions. Morphology*, 2010, N. 6, p.69-75.
4. Cowin S. C. The significance of bone microstructure in mechanotransduction. *Journal of Biomechanics* 2007, v. 40, (Suppl 1), p. S105-S109
5. Frank-Kamenetskaya O., Koltsov A., Kuzmina M. et al. Ion substitutions and non-stoichiometry of carbonated apatite-(CaOH) synthesised by precipitation and hydrothermal methods. *J. Molecular Structure*, 2011, v. 992, № 1-3, p. 9-18
6. Morris M. D., Finney W. F. Recent developments in Raman and infrared spectroscopy and imaging of bone tissue. *Spectroscopy*, 2004, 18, № 2, p. 155–159
7. Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2008, v. 43, № 2, p. 134–179
8. Rehman I., Smith R., Hench L. L., Bonfield W. Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy, *J. Biomedical Materials Research*, 1995, v. 29, № 10, p. 1287-1294

9. Rey C., Collins B., Goehl T. et al. The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Calcif. Tissue Int.*, 1989, v. 45, № 3, p. 157-164
10. Rey C., Miquel J.L., Facchini L. et al. Hydroxyl groups in bone mineral. *Bone*, 1995, v. 16, № 5, p. 583-586
11. Rulis P., Ouyang L., Ching W. Y. Electronic structure and bonding in calcium apatite crystals: Hydroxyapatite, fluorapatite, chlorapatite, and bromapatite. *Physical Review B*, 2004, v. 70, p. 155104-1-7
12. Tsai T. W. T., Chan J. C. C. Recent Progress in the Solid-State NMR Studies of Biomineralization. Chapter 1. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 2011, v. 73, p. 1-61
13. Wolff J. Das Gesetz der Transformation der inneren Architektur der Knochen bei pathologischen Veränderungen der äusseren Knochenform. *Sitzungsberichte der Königlich Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. Sitzung der phys.-math. Classe v. 21. April. — Mittheilung v. 13. Jan. 1884*, 23 p
14. Yoder C. H., Pasteris J. D., Worcester K. N., Schermerhorn D. V. Structural water in carbonated hydroxylapatite and fluorapatite: confirmation by solid state ^2H NMR. *Calcif. Tissue Int.*, 2012, v. 90, № 1, p. 60-67
15. А. С. Аврунин, А. А. Павлычев, Ю. И. Денисов-Никольский, А. А. Докторов, А. С. Виноградов, Е. О. Филатова, Ю. А. Кривосенко, И. И. Шубняков, Морфологические характеристики наноразмерных механизмов, определяющих механические и физико-химические свойства костной ткани, 2016, *Морфология* 5, 77-83
16. Денисов-Никольский Ю.И., Миронов С.П., Омеляненко Н.П., Матвейчук И.В. Актуальные проблемы теоретической и клинической остео-

- артрологии. М.:ОАО «Типография «Новости»; 2005. 336 с
17. Щербак И. Г. Биологическая химия. СПб., Изд-во СПбГМУ, 2005
 18. Byers P.H. Collagens: building blocks at the end of the development line. Clin. Genet., 2000, v. 58 № 4, p. 270-279
 19. Knott, L., Bailey, A. J. Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. Review Article, 22(3),181–187.
 20. Mohsin S, O'Brien FJ, Lee TC et al. (2006) . Three dimensional reconstruction of haversian canals using X-ray micro-computed tomography. BONE. vol. 38, S16-S16
 21. Alexander G. Robling, Sam D. Stout, Morphology of the Drifting Osteon, Cells Tissues Organs, vol.164, no. 4, pp. 192-204, 1999
 22. Berisio R., Vitagliano L., Mazzarella L., Zagari A. Recent progress on collagen triple helix structure, stability and assembly. Protein Pept. Lett., 2002, v. 9, №2, p. 107-116
 23. Омеляненко Н.П., Жеребцов Я.Д., Михайлов И.Н. Ультраструктура коллагеновых волокон и основного вещества дермы кожи человека. Архив АГЭ, 1977, Т. 72, № 4, с.69-76
 24. Аврунин, А.С. Уровни организации минерального матрикса костной ткани и механизмы, определяющие параметры их формирования (аналитический обзор) / А.С. Аврунин, Р.М. Тихилов, А.Б. Аболин, И.Г. Щербак, Морфология. – 2005. – Т. 127, № 2.– С. 78-82.
 25. Аврунин, А.С. Лекция по остеологии. Многоуровневый характер структуры минерального матрикса и механизмы его формирования / А.С. Аврунин, Р.М.Тихилов, А.Б. Аболин, И.Г. Щербак // Гений ортопедии. – 2005. – № 2. – С. 89-94
 26. Данильченко, С.Н. Структура и свойства апатитов кальция с точ-

- ки зрения биоминералогии и биоматериаловедения (Обзор)/ С.Н. Данильченко, Вісник Сумського державного університету. Серія Фізика, математика, механіка. — 2007. — №2. — С. 33-59
27. C K Loong, C Rey, L T Kuhn, C Combes, Y Wu, S.-H. Chen, M J Glimcher, Evidence of hydroxyl-ion deficiency in bone apatites: an inelastic neutron-scattering study, *Bone* 07/2000; 26(6)
 28. G Penel, G Leroy, C Rey, E Bres, MicroRaman spectral study of the PO_4 and CO_3 vibrational modes in synthetic and biological apatites, *Calcified Tissue International* 01/1999; 63(6) 475-81
 29. J.D. Pasteris, C.H. Yoder, and Brigitte Wopenka, Molecular water in nominally unhydrated carbonated hydroxylapatite: The key to bone mineral, *American Mineralogist*, 99, 16-27 (2014)
 30. Yin X., Stott M.J. Biological calcium phosphates and Posner's cluster. *J. Chem. Phys.* 2003; 118(8)3717-3723.
 31. Докторов, А. А. Структурная организация минеральной фазы костной ткани /Биомедицинские технологии. - 1999. - Вып. 12.-С. 42-52
 32. Докторов А.А., Денисов-Никольский Ю.И. Особенности рельефа минерализованной поверхности лакун и канальцев в пластинчатой кости. *Бюл. эксперим. медицины.* 1993; 119(1):61-65.
 33. Б. А. Жилкин, А. А. Докторов, Ю. И. Денисов-Никольский, Особенности строения пластинчатой кости позвонков человека при возрастной инволюции и остеопорозе / - С.476-480
 34. Б.А. Жилкин, Ю.И. Денисов - Никольский, А.А. Докторов, Структурная организация минерального компонента пластинчатой кости и процесс его формирования /Успехи современной биологии. - 2003. - Т.123, №6. - С.590-598
 35. WOPENKA, B., PASTERIS, J. D. (2005): A mineralogical perspective

- on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering*, 25, 131-143
36. J.D. Pasteris, B. Wopenka, E. Valsami-Jones, Bone and tooth mineralization: Why apatite?, *Elements*, 4, 97-104 (2008)
 37. Knothe Tate M. L. Multiscale computational engineering of bones: state-of-the-art insights for the future. In book: *Engineering of functional skeletal tissues*. 2007, p.141-160
 38. Currey J. D. Three analogies to explain the mechanical properties of bone. *Biorheology*, 1964, v. 2, p. 1-10.
 39. K. Matsunaga, A. Kbwabara, First-principles study of vacancy formation in hydroxyapatite, *Phys.Rev.B* 75, 2007, 014102.
 40. S.J. Naftel T.K. Sham, Y.M. Yiua, B.W. Yates, J. *Synchrotron Rad.* (2001), 8, 255-257
 41. Буланов Е.Н., Получение и исследование наноструктурированных биосовместимых материалов на основе гидроксиапатита, Нижегородский госуниверситет, 2012. – 103 с.
 42. Гусев А.И., Курлов А. С. Аттестация нанокристаллических материалов по размеру частиц (зерен) *Металлофизика и новейшие технологии*. 2008. Т. 30, №5. С. 679–694.
 43. В.Хейне, М.Коэн, Д.Уэйр, Теория псевдопотенциала, "Мир 1973.
 44. F. M. F. de Groot and J. C. Fuggle, $L_{2,3}$ X-ray-absorption edges of d^0 compounds: K^+ , Ca^{2+} , Sc^{3+} , and Ti^{4+} in O_h (octahedral) symmetry, *PhysRev B*, v.41, n.2, 1990.
 45. А.А. Павлычев, А.С. Виногровдов, А.П. Степанов, А.С. Шулаков, *Опт. Спектроскоп.* 75 (1993) 554 - 578
 46. А. А. Павлычев, А. Барри, А. С. Виноградов, *ФТТ*, 33 (1991) 2985 - 2992
 47. A.S. Vinogradov et al., Low-lying unoccupied electronic states in 3d

- transition-metal fluorides probed by NEXAFS at the F 1s threshold, Phys. Rev. B, 71 (2005) 045127
48. R. Flesch et al., Gas-to-Cluster Effects in S 2p-Excited SF_6 , J. Chem. Phys. 138 (2013) 144302
 49. Weiner S., Wagner H.D. 1998 Annu. Rev. Mater. Sci. 28 271 – 98
 50. Buehler M. 2007 Nanotechnology 18 295102
 51. Fratzl P., Weinkamer R. 2007 Prog. Nat. Sci. 52 1263-334.
 52. Neuman W.F., Neuman M.W. 1958 The chemical dynamics of bone mineral (Chicago: University of Chicago Press)
 53. Hancox M.N. 1972 Biology of bone (Cambridge: Cambridge University Press)
 54. Currey J., 1984, The mechanical adaptation of bones (Princeton, NJ: Princeton University Press)
 55. Currey J. 2001 Nature 414 (6865) 699
 56. Avrunin A.S., Tihilov R.M., Parshin L.K., Shubniakov I.I. 2008 Traumatologiya i Ortopediya Rossii [Traumatology and Orthopedics] 2 (48) 77-83
 57. Gautieri A., Vicentini S., Redaelli A., Buehler M. 2011 Nano Lett. 11 (2) 757-66
 58. Avrunin A.S., Denisov-Nikolsky Yu.I., Doktorov A.A., Krivosenko Yu.S., Samoilenko D.O., Pavlychev A.A., Shubniakov I.I. 2015 Traumatologiya i Ortopediya Rossii [Traumatology and Orthopedics], 3, 37 – 50
 59. Frank-Kamenetskaya O, Koltsov A, Kuzmina M, Zorina M, Poritskaya L., 2011 J. Molecular Structure 992(1-3) 9-18
 60. Legros R., Balmain N., Bonel G., 1987 Calcified tissue international 41 (3) 137–44.
 61. Bertazzo, S.; Bertran, C. A.; Camilli, J. A. 2006 Key Engineering

Materials 309-311 11-14

62. Nyholm R., Svensson S., Nordgren J., Flodstrom A. 1986 Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A 246 267-71
63. Lukirskii, A. P., Brytov, I. A. 1964 Sov. Phys - Solid State 6 43-53.
64. Gudat W., Kunz C. 1972 Phys. Rev. Lett. 29 169-72.
65. Bruhwiler P. A., Maxwell A. J., Nilsson A., Whetten R. L., Martensson N. 1992 Chem. Phys. Lett. 193 311-16.
66. Schaefers F. et al. 1997 App. Opt. 38 4074-88
67. Gaupp A., Schaefers F., MacDonald M., Uschakow S., Salashchenko N.N., Gaykovich P.P. 2013 J. Phys. Conf. Ser. 425 122013-016
68. Cappa C.D., Smith J.D., Wilson K.R., Saykally R.J. 2008 J. Phys. Cond. Matter 20 205105
69. Cosmidis J., Benzerara K., Nassif N., Tyliczszak T., Bourdelle F. 2015 Acta Biomaterialia 12 260 - 69
70. Eiden-Assmann S., Wiertanhaus M. 2000 In-Situ XANES Spectroscopy at the Ca K edge of calcium phosphate compounds
71. Yang S., Wang D., Liang G., Yiu Y.M., Wang J., Sun X., Sham T.K. 2012 Energy Envi-ron. Sci 5 7007-16
72. Rajendran J. 2011 XANES and FTIR study of dried and calcined bones. Master Thesis, The University of Texas at Arlington
73. Mkukuma L.D., Skakle J.M.S., Gibson I.R., Imrie C.T., Aspden R.M., Hukins D.W.L. 2004 Calcif Tissue Int. 75 321 – 28.
74. Headrick J.M., Diken E.G., Walters R.S., Hammer N.I., Christie R.A., Cui J., Mishakin E.M., Duncan M.A., Johnson M.A., Jordan K.D. 2005 Science 308 1765-69
75. Robertson W.H., Diken E.G., Price E.A., Shin J.W., Johnson M.A. 2003 Science. 299 1367-72

76. Megyes T., Balint S., Grosz T., Radnai T., Bako I., Sipos P. 2008 J. Chem. Phys. 128 044501
77. Aziz E.F., Ottosson N., Faubel M., Hertel I.V., Winter B. 2008 Nature 455 89-91
78. Cappa C.D., Smith J.D., Messer B.M., Cohen R.C., Saykally R.J. 2006 J. Phys. Chem. B 110 5301-09
79. Nuevo M., Milam S.N., Sanford S.A., De Gregorio B.T., Cody G.D., Kilcoyne A.L.D. 2011 J. Adv, Space Res. 48 1126-35
80. Gordon M.L., Cooper G., Morin C., Araki T., Turci C.C., Kaznatcheev K., Hitchcock A.P 2003 J. Phys. Chem. A 107(32) 6144–59
81. Remmers G., Domke M., Puschmann A., Mandel T., Xue C., Kaindl G., Hudson E., Shir-ley D.A. 1992 Phys Rev A 46 3935-44
82. Triguero L., Pettersson L.G., Agren H. 1998 Phys Rev B 58 8097-110
83. Hitccock A.P., Brion C.E. 1980 JEI SPEC 19 231-50
84. Yin Z., Kasrai M., Banckroft G.M., Tan K.H., Feng X., 1995 Phys Rev B, 51 742-50
85. Pavlychev A.A., Vinogradov A.S., Zimkina T.M., Onopko D.E., Titov S.A. 1982 Optics Spectrosc. 52 506-09
86. A. Nikolaev, V.V. Bazhenov, O.V. Frank-Kamenetskaya, O.V. Petrova, edited by Hermann Ehrlich (Springer, 2017) DOI: 10.1007/978-3-319-45340-8
87. D. O. Samoilenko, A. S. Avrunin, A. A. Pavlychev, Hierarchy Effect on Electronic Structure and Core-to-Valence Transitions in Bone Tissue: Perspectives in Medical Nanodiagnostics of Mineralized Bone, EPJ D (Accepted)
88. Wilson EE., Awonusi A., Morris M.D., Kohn D.H., Tecklenburg M.M.J., Beck L.W. Highly ordered interstitial water observed in bone by

- nuclear magnetic resonance. Journal of bone and mineral research. 2005; 20(4):625-634.
89. Thompson JB, Kindt JH, Drake B, Hansma IG, Morse DE, Hansma PK. Bone indentation recovery time correlates with bond reforming time. Nature. 2001; 414(13):773-775.
 90. J D Terminb, A S Posnee "Amorphous/Crystalline interrelationships in bone mineral"Calc. Tiss. Res. 1, 8-23, 1967.
 91. A A Pavlychev, A S Avrunin, A S Vinogradov, E O Filatova, A A Doctorov, Yu S Krivosenko, D O Samoilenko, G I Svirskiy, A S Konashuk and D A Rostov, Nanotechnology 27 (2016) 504002 (8pp)
 92. K.Kummer, V.N. Sivkov, D. V. Vyalikh et al. Oscillator strength of the peptide bonds π^* resonance in all relevant X-ray absorption edges. PRB 80 (2009) 155433